

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

# **Herzinsuffizienz durch Drucküberlastung im Schweinemodell; Rolle von miRNA-132**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Sarah Straub  
aus Landshut

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof Dr. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Julinda Mehilli

Prof. Dr. Markus Sperandio

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Rabea Hinkel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2018

## Meinen Eltern

## Inhalt

1. Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1. Definition und Krankheitsbild der Herzinsuffizienz .....	1
1.1.1. Epidemiologie und wirtschaftliche Aspekte.....	2
1.1.2. Ätiologie.....	3
1.1.3. Pathomechanismen.....	4
1.1.4. Klinik und Klassifikation .....	6
1.1.5. Diagnostik .....	8
1.1.6. Therapiestrategien .....	9
1.1.7 Prognose .....	14
1.2. Molekularbiologische Grundlagen .....	14
1.2.1. miRNA .....	14
1.2.2. miRNA-Inhibitoren .....	18
1.3. Etablierte Modelle der Herzinsuffizienz .....	21
1.4. Fragestellung .....	24
2. Material und Methoden .....	25
2.1. In-vivo Experiment.....	25
2.1.1. Versuchstier: Deutsches Landschwein.....	25
2.1.2. Versuchsdurchführung .....	25
2.1.3. Messung hämodynamischer Parameter .....	28
2.2. Histologie und Molekularbiologie.....	31
2.2.1. Kardiomyozytengröße .....	32
2.2.2. Mikrozirkulation.....	33
2.2.3. Quantifizierung der Fibrose.....	35
2.3. Statistik.....	37
3. Ergebnisse .....	38
3.1. Etablierung eines neuen perkutanen Modells der Herzinsuffizienz durch Pressure Overload... 38	
3.1.1. Hämodynamik .....	38
3.1.2. Hypertrophie.....	44
3.1.3. Kapillarisierung.....	46
3.1.4. Fibrose .....	47
3.2. miRNA-132 Inhibition .....	48
3.2.1. Hämodynamik .....	48
3.2.2. Hypertrophie.....	53
3.2.3. Kapillarisierung.....	54

3.2.4. Fibrose .....	56
4. Diskussion .....	57
4.1. Das pTAC-Modell als neues translationales Großtiermodell zur Herzinsuffizienz .....	57
4.1.1. Vorteile eines Großtiermodells.....	57
4.1.2. Interaktion zwischen Hämodynamik, Hypertrophie und Fibrose.....	58
4.1.3. Varianten des Modells .....	63
4.2. Inhibition von miRNA-132 im Modell.....	65
4.2.1. Beeinflussung von Hämodynamik, Hypertrophie und Fibrose .....	65
4.2.2. Vergleich mit anderen miRNAs .....	67
4.3. Klinischer Ausblick.....	71
5. Zusammenfassung .....	75
6. Abkürzungsverzeichnis .....	76
7. Literaturverzeichnis.....	79
8. Danksagung .....	87

# **1. Einleitung und Fragestellung**

## **1.1. Definition und Krankheitsbild der Herzinsuffizienz**

Die Herzinsuffizienz ist nach der aktuellen nationalen Versorgungsleitlinie definiert als Unfähigkeit des Herzens, den Organismus mit ausreichend Blut und damit mit genügend Sauerstoff zu versorgen, um den Stoffwechsel unter Ruhe- wie unter Belastungsbedingungen zu gewährleisten. [1, 2] Man unterscheidet verschiedene Entitäten der Herzinsuffizienz. Zum einen differenziert man nach dem Herzzeitvolumen (HZV), zum anderen nach der bevorzugt betroffenen Herzkammer, sowie dem zeitlichen Verlauf der Entwicklung einer Herzinsuffizienz. [1, 3] So gibt es zum einen den sogenannte Low-Output-Failure, welches als Vorwärtsversagen des Herzens mit Verminderung des HZV und kühler Peripherie definiert ist. [3] Zum anderen spricht man vom sogenannten High-Output-Failure mit mangelhafter Blut- und Sauerstoffversorgung der Peripherie bei erhöhtem HZV und warmer Peripherie. Dies tritt eher im Rahmen von Anämien, Hyperthyreose und arteriovenösen Fisteln auf. [3] Auch im Rahmen einer Sepsis, beziehungsweise eines septischen Schocks kann es zu Symptomen der Herzinsuffizienz kommen: Hierbei beobachtet man initial eine hyperdynamische Frühphase mit erhöhtem HZV und Vasodilatation (wird formal dem High-Output-Failure zugeordnet) und im Verlauf eine hypodynamische Spätphase, welche mit einem Abfall des Blutdrucks und des HZV, Hypovolämie und Vasokonstriktion formal dem Low-Output-Failure zugeordnet werden kann. [3, 4] In Bezug auf die Lokalisation der Herzinsuffizienz spricht man, je nach Beteiligung der Ventrikel von Links-, Rechts- oder, wenn beide Ventrikel betroffen sind, von einer Globalherzinsuffizienz. [1, 3] Des Weiteren ist die Einteilung im Rahmen der Pathophysiologie von Bedeutung: Je nachdem, ob vor allem der systolische oder der diastolische Anteil der Pumpaktion eingeschränkt ist, spricht man von systolischer Herzinsuffizienz als Folge einer myokardialen Kontraktionsstörung, beziehungsweise von diastolischer Herzinsuffizienz als Folge einer Dehnbarkeitsverminderung in der Diastole und Relaxationsstörung des linken Ventrikels. Möglich sind auch kombinierte systolische und diastolische Ventrikelfunktionsstörungen. [1, 3] Darüber hinaus ist noch die zeitliche Einordnung der Herzinsuffizienz von Bedeutung: Eine akute dekompensierte Herzinsuffizienz entsteht beispielsweise durch myokardiales Pumpversagen im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms, beziehungsweise nach Myokardinfarkt oder durch mechanische Behinderung der Ventrikelfüllung, zum Beispiel durch eine Perikardtamponade, sowie durch tachykarde und bradykarde

Herzrhythmusstörungen. [3] Im Gegensatz dazu entwickelt sich die chronische Herzinsuffizienz im Verlauf von Monaten oder Jahren. [1, 3]

In der aktuellen Leitlinie der europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) von 2016 wird die chronische Herzinsuffizienz anhand der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) noch weiter unterteilt [5]: Patienten mit einer LVEF  $\geq 50\%$  repräsentieren die Gruppe der Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF). Eine LVEF  $< 40\%$  entspricht einer Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF), der Graubereich dazwischen (LVEF 40-49 %) wird als Herzinsuffizienz mit mittlerer Ejektionsfraktion (HFmrEF) bezeichnet. Die oben bereits erwähnte diastolische Dysfunktion wird vor allem der HFpEF zugeordnet, während der HFrEF eher eine systolische Funktionsstörung zugrund liegt. Allerdings zeigen viele Patienten mit HFrEF auch eine diastolische Dysfunktion, sodass eine eindeutige Zuordnung anhand der Entitäten „systolische/diastolische Herzinsuffizienz“ oftmals schwierig ist. [5] Eine Einteilung mittels HFpEF/HFrEF/HFmrEF ist zu bevorzugen.

### **1.1.1. Epidemiologie und wirtschaftliche Aspekte**

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems stellen die vorherrschende Ursache für Morbidität und Mortalität des Menschen in den Industrieländern dar. [6] Aus epidemiologischer Sicht ist festzustellen, dass die Prävalenz der chronischen Herzinsuffizienz altersabhängig ist. [7, 8] Inzidenz und Prävalenz haben in den vergangenen Jahrzehnten in Deutschland, wie auch in anderen Industrieländern stetig zugenommen. Man nimmt an, dass derzeit etwa 1,8 Millionen Menschen in Deutschland an einer chronischen Herzinsuffizienz leiden und jährlich 200.000 bis 300.000 Patienten neu hinzukommen. [9]

Der Inzidenzgipfel liegt in der siebten und achten Lebensdekade, wobei in den jüngeren Altersklassen eher Männer betroffen sind und in den höheren eher Frauen. Darüber hinaus liegt bei Männern häufiger eine HFrEF vor, während es bei der HFpEF ein nahezu ausgewogenes Geschlechterverhältnis gibt. Insgesamt hält sich das Geschlechterverhältnis die Waage. [10] In Deutschland gehört die chronische Herzinsuffizienz zu den häufigsten Diagnosen bei vollstationären Patienten, ebenso wie zu den häufigsten Todesursachen. [11]

Darüber hinaus lässt die zunehmende Alterung der Bevölkerung und die verbesserten Überlebenschancen von Personen mit akutem Herzinfarkt, Herzklappenvitien und Kardiomyopathien erwarten, dass die Patientenzahlen mit der Diagnose Herzinsuffizienz in den nächsten Dekaden weiter ansteigen. [11, 12]

Genaue Zahlen zur Inzidenz und Prävalenz der chronischen Herzinsuffizienz sind für Deutschland nur bedingt verfügbar, weswegen an dieser Stelle internationale Daten mit einbezogen werden. [1]

Eine aktuelle Stellungnahme der American Heart Association (AHA) [13] besagt, dass laut einer Prognose des Statistischen Bundesamtes der Vereinigten Staaten die Zahl der Patienten mit Herzinsuffizienz von aktuell 5,8 Millionen im Jahr 2012 auf über 8,4 Millionen im Jahr 2030 steigen wird. Mehr als 2 Millionen dieses Kollektivs werden über 80 Jahre alt sein, dies entspricht über 26 % aller Patienten mit Herzinsuffizienz. [13] Insgesamt entspricht dies einer Zunahme der Herzinsuffizienzprävalenz in den Vereinigten Staaten von 23 % (von 2,42 % im Jahr 2012 auf 2,97 % im Jahr 2030). [13] Die Gesamtanzahl der Amerikaner mit der Diagnose Herzinsuffizienz wird damit von 2012 bis 2030 um 46 % zunehmen. [13]

Daher nimmt auch die volkswirtschaftliche Bedeutung der chronischen Herzinsuffizienz dramatisch zu: Heidenreich et al. [13] postulieren einen 2,5 fachen Anstieg der direkten medizinischen Kosten von 20,9 Milliarden Dollar im Jahr 2012 auf 53,1 Milliarden Dollar im Jahr 2030. Über 80 % dieser Kosten werden den Hospitalisierungen zuzuschreiben sein.

Werden die indirekten Kosten durch Morbidität (entspricht verlorenem Einkommen durch Arbeitsplatzverlust und verringerter Produktivität im Haushalt wegen Herzinsuffizienz) und Mortalität (entspricht verlorenem Einkommen durch vorzeitigem Tod aufgrund von Herzinsuffizienz) mit eingerechnet, kommt es zu einem Anstieg der Kosten für das Krankheitsbild Herzinsuffizienz von 30,7 Milliarden Dollar im Jahr 2012 auf 69,8 Milliarden Dollar im Jahr 2030. [13, 14]

Diese Prognosen geben trotz ihrer großen Beträge nicht die Gesamtkosten wieder, welche entstünden, wenn man wirklich alle Patienten mit Herzinsuffizienz (Komorbiditäten herausgerechnet) entsprechend ihrem medizinischen Betreuungsaufwand in die Rechnung mit einbezöge: In diesem Fall würden die direkten medizinischen Kosten im Jahr 2030 in den Vereinigten Staaten etwa dreimal so viel, nämlich 160 Milliarden Dollar betragen. [13] Diese Daten lassen sich entsprechend den jeweiligen Gesundheitssystemen annähernd auf europäische Länder übertragen.

### **1.1.2. Ätiologie**

Die häufigsten Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz sind mit 70-90 % der Fälle bei weitem die arterielle Hypertonie und die koronare Herzkrankheit (KHK). [1, 3, 15, 16] Darüber hinaus kann die Herzinsuffizienz durch eine Vielzahl an selteneren Erkrankungen,



wie nichtischämische Kardiomyopathien, Herzklappenerkrankungen, Arrhythmien oder Perikarderkrankungen verursacht werden. [1] Etwa 2-3 % der Fälle können derzeit ursächlich auf Alkoholmissbrauch zurückgeführt werden. [1] Außerdem können einige Medikamente eine Herzinsuffizienz verursachen, wie zum Beispiel Anthrazykline, Tumornekrosefaktor-antagonisten wie Infliximab, und andere wie Clozapin, Amphotericin B oder Immunmodulatoren, wie zum Beispiel Interferone. [1, 16-20]

### **1.1.3. Pathomechanismen**

Grundsätzlich beginnt eine chronische Herzinsuffizienz mit einer myokardialen Schädigung, oftmals durch Druck- oder Volumenbelastung. [2, 21] Die daraus resultierende Verminderung der linksventrikulären Funktion aktiviert nachfolgend beschriebene Gegenregulationsmechanismen, die zwar kurzfristig die Herzleistung aufrechterhalten, langfristig jedoch zu einer weiteren myokardialen Zellschädigung und einer Manifestation der Herzinsuffizienz führen. [1, 2, 21]

Obwohl es latent schwierig ist, universelle Mechanismen der chronischen Herzinsuffizienz zu definieren, geraten die komplexen Entstehungsmechanismen dieses Krankheitsbildes in den Fokus und bilden die Grundlage unterschiedlicher Interventionsansätze. [1, 3, 22]

In der vorliegenden Arbeit ist die Drucküberlastung als Ursache der Hypertrophie des Herzens Gegenstand des Interesses. Auf die weiteren Veränderungen soll jeweils der Vollständigkeit halber kurz eingegangen werden.

#### ***1.1.3.1. Morphologische Veränderungen***

Die chronische Herzinsuffizienz zeichnet sich durch morphologische Veränderungen des Myokards aus. Verschiedene Ursachen liegen den unterschiedlichen Ausprägungen der Herzinsuffizienz zugrunde (vgl. [3, 23, 24]): kardiale Ischämie und toxische Faktoren führen eher zu einer Dilatation linken Ventrikels. Genetische Faktoren können sowohl zu einer Dilatation, als auch zu einer linksventrikulären Hypertrophie führen. Häufigere Ursachen dafür sind arterielle Hypertension und Aortenstenosen. [3]

Für vorliegende Arbeit sind vor allem die Hypertrophie des linken Ventrikels und das kardiale Remodeling von Bedeutung. [22, 25] Erstere unterscheidet sich, je nach zugrunde liegender Belastung, in eine konzentrische Hypertrophie durch erhöhte Druckbelastung, oder in eine exzentrische Hypertrophie durch erhöhte Volumenbelastung (zum Beispiel

Klappeninsuffizienzen). [3] Eine erhöhte Druckbelastung wird wie oben genannt, vor allem durch arterielle Hypertonie verursacht, es kann jedoch beispielsweise auch eine Aortenklappenstenose oder eine hypertrophe Kardiomyopathie zugrunde liegen. Durch jegliche dieser Ursachen kommt es zu einem erhöhten Auswurfwiderstand, gegen welchen das Herz anpumpen muss, was schließlich zum hypertrophen Wachstum der Kardiomyozyten im Sinne einer Anpassungsreaktion führt.

Der konzentrischen, beziehungsweise exzentrischen Hypertrophie ist jeweils ein klar abgrenzbares, morphologisches Wachstumsmuster zuzuordnen. Es ist festzuhalten, dass es durch die pathologische Hypertrophie zu gravierenden Konsequenzen für die kardiale Funktion kommt, wobei wiederum das Hypertrophiemuster entscheidend für den Schweregrad der Dysfunktion ist. (vgl. [26-29])

Durch die Hypertrophie kommt es letztendlich auch zu einer ischämischen Schädigung der Kardiomyozyten, welche apoptotisch und dann fibrotisch ersetzt werden. Folglich nehmen mit zunehmendem Bindegewebsanteil die Kontraktilität ab und die Steifigkeit des Ventrikels zu, was wiederum die Ventrikelfüllung verringert. [30, 31] Es entwickelt sich konsekutiv eine diastolische Funktionsstörung. Mikroskopisch beobachtet man unter anderem eine interstitielle Fibrose, die Vermehrung der Mitochondrien und eine Verbreiterung der Z-Streifen, das sogenannte Remodeling des Herzens. [3]

### ***1.1.3.2. Funktionelle Veränderungen***

Ausgangspunkt klinisch fassbarer Veränderungen ist die Abnahme der linksventrikulären, systolischen Pumpfunktion entweder gekoppelt mit einer Abnahme der diastolischen Relaxation oder als eigenständige Ursache. [1, 32] Am gesunden Herzen kann die Kontraktilität und damit die Pumpfunktion durch die Aktivierung des Sympathikus über verschiedene Mechanismen gesteigert werden: zum einen durch den Frank-Starling-Mechanismus, zum anderen durch den Bowditch-Effekt oder die Stimulation der Adenylatcyclase. Mit fortschreitender Insuffizienz des Herzmuskels versagen diese Kompensationsmechanismen zunehmend. [3] Somit sinkt das maximal erreichbare HZV zunächst nur unter Belastung ab, später auch schon in Ruhe. [3] Im Vergleich zum Gesunden kann der insuffiziente Herzmuskel ein bestimmtes Schlagvolumen nur noch bei erhöhtem linksventrikulärem enddiastolischen Druck (LVEDP) fördern. [3]

### ***1.1.3.3. Neurohumorale Aktivierung***

Im Zusammenspiel führen diese Veränderungen zur Aktivierung einer Vielzahl an neurohumoralen Gegenregulationsmechanismen: So kommt es durch den schon aktivierten Sympathikus und der damit gesteigerten Katecholaminausschüttung zu einer Steigerung der Herzfrequenz, welche anfangs die Kontraktilität sogar noch steigert. [3] Mit zunehmender Insuffizienz des Herzens steigt der Noradrenalin Spiegel im Plasma, während gleichzeitig die kardialen Betarezeptoren herunter reguliert werden. Dadurch wirken die Katecholamine am Myokard immer weniger inotrop, erzeugen aber in der Peripherie über eine Steigerung des Arteriolentonus eine Erhöhung des peripheren Widerstands und damit der Nachlast. [3] Die Erhöhung der Nachlast führt wiederum zu morphologischen Veränderungen im Sinne einer Hypertrophie (vgl. 1.1.3.1.) Darüber hinaus kommt es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), welches über Angiotensin II zu einer Vasokonstriktion und damit zu einer Nachlasterhöhung führt. Dies begünstigt erneut die Entstehung einer kardialen Hypertrophie. Zusätzlich kommt es über die Aldosteronwirkung, sowie unabhängig vom RAAS durch die vermehrte Ausschüttung von Vasopressin, zu einer Natrium- und Wasserretention und damit zu einer Vorlasterhöhung. [1, 3] Bei chronischer Dauerstimulation des RAAS entwickelt sich ein sekundärer Hyperaldosteronismus, welcher zu hypokaliämiebedingten Rhythmusstörungen führen kann. Insgesamt kommt es durch die neurohumorale Aktivierung letztendlich zu einem Circulus vitiosus, welcher insbesondere die myokardiale Hypertrophie noch verstärkt. [1, 3]

Im Gegensatz dazu steht die Ausschüttung der natriuretischen Peptide, vor allem vom Typ A (ANP = atrial natriuretic peptide) und vom Typ B (BNP = brain natriuretic peptide). BNP wirkt vasodilatorisch und natriuretisch-diuretisch, indem es eine hemmende Wirkung auf das RAAS ausübt. Mit zunehmender Herzinsuffizienz steigt der BNP-Spiegel. [3, 32]

### **1.1.4. Klinik und Klassifikation**

Die Klinik der chronischen Herzinsuffizienz stellt sich vor allem durch die Symptome der Linksherzinsuffizienz dar, dennoch kann es im Verlauf durch einen Blutrückstau ins rechte Herz auch zu Symptomen der Rechtsherzinsuffizienz kommen. [3]

Die Kardinalsymptome der Linksherzinsuffizienz sind Dyspnoe, anfangs nur bei Belastung, später auch in Ruhe, sowie Lungenödeme. [3, 33] Darüber hinaus kommt es zu einer allgemeinen Leistungsminderung, Schwächegefühl und Zyanose, sowie insbesondere bei

älteren Patienten zu zerebralen Funktionsstörungen. [3]

Auch Pleuraergüsse sind häufig und treten bei jeglicher Form der Herzinsuffizienz auf. [3] Periphere, symmetrische Tibia- beziehungsweise Knöchelödeme sind eher für die Rechtsherzinsuffizienz charakteristisch. In schweren Fällen kommt es auch zu Ödemen am Körperstamm, sogenannten Anasarka. [3] Diese Ödeme werden oftmals in der Nacht ausgeschwemmt, was zu einer für die Patienten belastenden Nykturie führt.

Mögliche Komplikationen einer Herzinsuffizienz sind Herzrhythmusstörungen wie Vorhofflimmern oder AV-Blöcke. [3] Etwa ein Drittel aller Patienten mit Herzinsuffizienz stirbt am plötzlichen Herztod durch ventrikuläre Tachykardien, Kammerflimmern oder Asystolien. Darüber hinaus kommt es zu Thrombembolien, schweren Lungenödemen, akuten Dekompensationen und kardiogenem Schock. [3] Die gängigste Stadieneinteilung der Herzinsuffizienz erfolgt nach den Kriterien der New York Heart Association (NYHA) in vier Stadien: [1, 3]

<b>NYHA I</b> (asymptomatisch)	Herzerkrankung ohne körperliche Einschränkung. Alltägliche körperliche Belastung induziert keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina Pectoris Beschwerden.
<b>NYHA II</b> (leicht)	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe oder bei geringer Anstrengung. Stärkere körperliche Belastung wie z.B. Bergaufgehen oder Treppensteigen, verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina Pectoris.
<b>NYHA III</b> (mittelschwer)	Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Ruhebeschwerden. Geringe körperliche Belastung, wie z.B. Gehen in der Ebene verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina Pectoris.
<b>NYHA IV</b> (schwer)	Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Meist Bettlägerigkeit.

**Abbildung 1: NYHA-Klassifikation der chronischen Herzinsuffizienz. [modifiziert nach 1]**

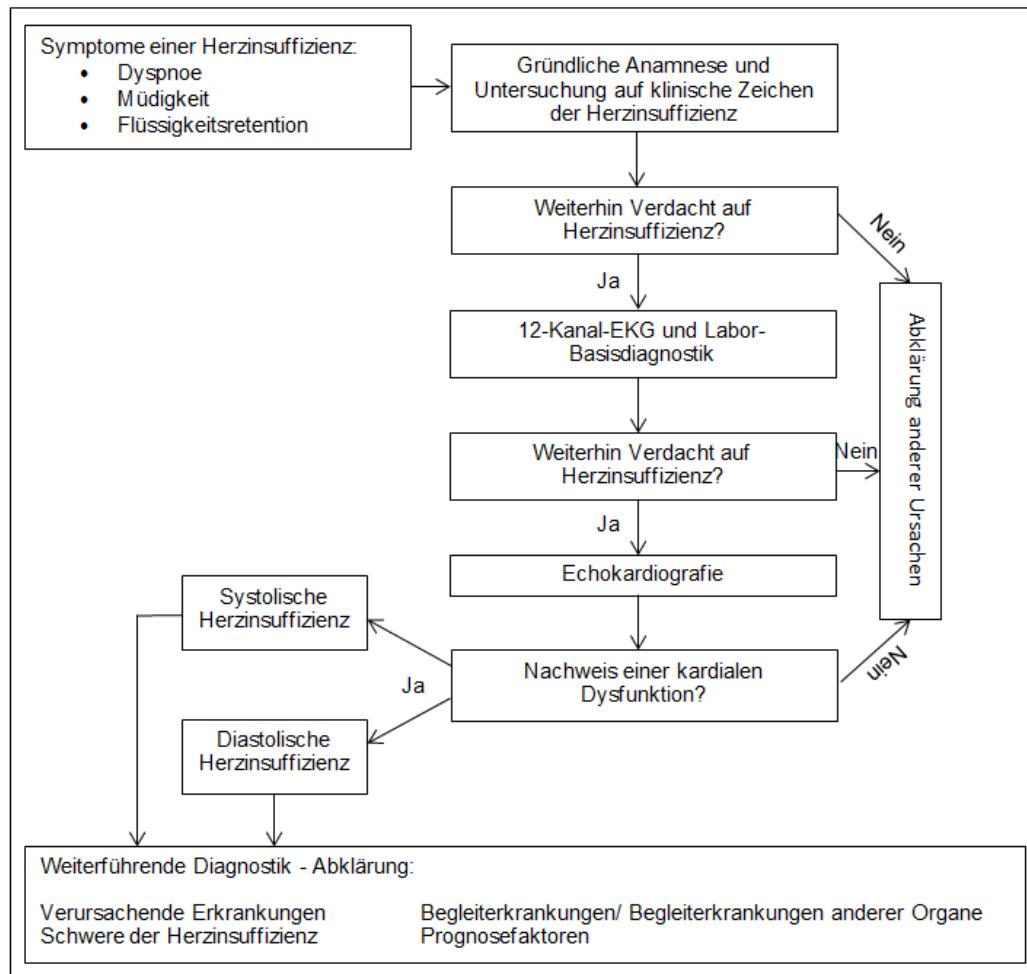
Um die Einteilung nach diesen subjektiven Kriterien auch messbar etwas objektivieren zu können, erfolgt die Korrelation unter anderem mit der Belastbarkeit und dem Herzminutenvolumen der Patienten. [3] So ist ein Stadium NYHA I bis 150 Watt und höher belastbar und hat sowohl in Ruhe, als auch unter Belastung ein normales Herzminutenvolumen (HMV). Im Stadium NYHA IV ist eine Belastungsuntersuchung nicht mehr möglich und das HMV ist schon in Ruhe eingeschränkt. [3]

### **1.1.5. Diagnostik**

Eine genaue Anamnese mit der Erhebung von Risikofaktoren wie Hypertonie, Nikotinabusus, Übergewicht und Diabetes mellitus sowie den vorliegenden Symptomen, liefert oft bereits Hinweise auf Ursachen und Schweregrad der Herzinsuffizienz. [15] Eine anschließende, ausführliche körperliche Untersuchung zeigt die Symptomlokalisation. Laboruntersuchungen sind eher zielführend im Hinblick auf die Ursachenforschung, lediglich die Parameter BNP und NT-proBNP gelten als diagnostische Marker für eine Herzinsuffizienz und können auch als Verlaufsparemeter genutzt werden (akuter Beginn: BNP > 100 pg/ml, NT-proBNP > 300 pg/ml; nicht-akuter Beginn: BNP > 35 pg/ml, NT-proBNP > 125 pg/ml). Im EKG können sich atriale/ventrikuläre Hypertrophiezeichen, Vorhofflimmern oder -flattern, Schenkelblöcke und Erregungsrückbildungsstörungen zeigen. [1, 3]

Die diagnostische Methode der Wahl ist die Echokardiografie, welche Aufschluss über die Morphologie und Funktion des Herzens gibt. [3] Darüber hinaus ist eine Aussage über das Ausmaß der ventrikulären Hypertrophie im Sinne einer pathophysiologischen Reaktion möglich. Weiterhin ermöglicht die Echokardiografie eine Differenzierung zwischen systolischer und diastolischer Dysfunktion. [1] Auch ein Röntgen-Thorax in 2 Ebenen ist zur Diagnosefindung hilfreich: so kann man Zeichen der Lungenstauung wie Kerley B-Linien oder eine hiläre Zeichnungsvermehrung, ebenso wie eine eventuelle globale oder isolierte Hypertrophie des Herzens, beziehungsweise einzelner Anteile erkennen. [3] Bei speziellen Fragestellungen kann noch Zusatzdiagnostik betrieben werden, so zum Beispiel ein Belastungs-/Langzeit-EKG, eine Myokardszintigrafie sowie ein Kardio-MRT oder eine Koronarangiografie. [1, 3]

Nachfolgende Abbildung zeigt den aktuellen Diagnostikalgorithmus der nationalen Versorgungsleitlinie:



**Abbildung 2: Aktueller Algorithmus der Diagnostik zur chronischen Herzinsuffizienz nach der nationalen Versorgungsleitlinie. [modifiziert nach 1]**

### 1.1.6. Therapiestrategien

Die etablierten Therapiestrategien der chronischen Herzinsuffizienz stützen sich auf mehrere Säulen: So ist zum einen die kausale Therapie von essentieller Bedeutung, zum anderen steht die symptomatische Therapie aufgrund der Komplexität und Multifaktorialität der Herzinsuffizienzursachen aktuell noch im Vordergrund. [34, 35] Zu den kausalen Therapieansätzen gehören die Therapie der arteriellen und der pulmonalen Hypertonie, genauso wie die Revaskularisation bei KHK. [3, 36, 37] Außerdem müssen andere Ursachen, wie eine Myokarditis, oder Herzrhythmusstörungen adäquat behandelt werden. Herzklappenvitien oder eine konstriktive Perikarditis sollten operativ versorgt werden. [3] In der vorliegenden Arbeit soll als weiterer Ansatz die gezielte Therapie der morphologischen

Veränderungen, die im Rahmen einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz auftreten, (vgl. 1.1.3.1.) in den Vordergrund gestellt werden. Insbesondere die selektive Therapie der Hypertrophie durch neue RNA-Moleküle, sogenannte miRNA-Inhibitoren ist von Interesse und wird unter 4.2. näher beleuchtet. (vgl. 1.2.)

#### ***1.1.6.1. Lifestyle-Modifikation und Allgemeinmaßnahmen***

Bei den nicht medikamentösen Therapieansätzen ist es wichtig, auf die individuelle Situation des Patienten einzugehen. Grundsätzlich sollte eine Reduktion der kardiovaskulären Risikofaktoren erfolgen, hierzu gehört ganz besonders die Raucherentwöhnung. [1, 38] Zudem sollten Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz auf ihr Gewicht achten und sich täglich zu einem festen Zeitpunkt wiegen, um bei einem plötzlichen, für den Patienten unüblichen Gewichtsanstieg unverzüglich den behandelnden Arzt benachrichtigen zu können. [1, 39] Gegebenenfalls muss eine Restriktion der Flüssigkeitszufuhr verordnet werden, um der Entstehung von Ödemen vorzubeugen. [1] Im Falle einer stabilen Herzinsuffizienz sollte ein ärztlich kontrolliertes, sporttherapeutisches Trainingsprogramm durchgeführt werden. [3] Ebenso zeigt die Einführung leichter Kost, kleiner Mahlzeiten und das Weglassen von Mahlzeiten am späten Abend, sowie eine kaliumreiche, kochsalzarme Diät positive Effekte auf den Krankheitsverlauf. [3] Patienten mit einer alkoholtoxischen Kardiomyopathie sollten strikte Alkoholkarenz einhalten. [1, 38]




#### ***1.1.6.2. Medikamentöse und apparative Therapie***

Aktuell gibt es keine kausale medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz, dennoch ist sie wohl die wichtigste Säule bei der Behandlung dieser Erkrankung. Hierbei ist wichtig, zwischen prognoseverbessernden und symptomatisch unterstützenden Medikamenten zu differenzieren. Therapiert wird nach den NYHA-Stadien. [3]

Im Folgenden werden die klassischen Medikamente, die in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz eingesetzt werden, vorgestellt.

Auf die potentiellen neuen Therapeutika, die gezielt zur Therapie der Hypertrophie eingesetzt werden, wird unter 4.2. näher eingegangen.

	<b>NYHA I</b>	<b>NYHA II</b>	<b>NYHA III</b>	<b>NYHA IV</b>
<b>ACE-Hemmer</b>	<i>indiziert</i>	<i>indiziert</i>	<i>indiziert</i>	<i>Indiziert</i>
<b>AT<sub>1</sub>-Antagonisten</b>	Bei ACE-Hemmer-Intoleranz	Bei ACE-Hemmer-Intoleranz	Bei ACE-Hemmer-Intoleranz	Bei ACE-Hemmer-Intoleranz
<b>ARNI</b>		<i>Indiziert (statt ACE-Hemmer)</i>	<i>Indiziert (statt ACE-Hemmer)</i>	<i>Indiziert (statt ACE-Hemmer)</i>
<b>β-Blocker</b>	Nach Myokardinfarkt/ bei Hypertonie	<i>indiziert</i>	<i>indiziert</i>	<i>indiziert</i>
<b>Aldosteronantagonisten</b>	Nach Myokardinfarkt bei Hypertonie	Nach Myokardinfarkt	<i>indiziert</i>	<i>indiziert</i>
<b>Thiaziddiuretika</b>		Bei Flüssigkeitsretention	<i>indiziert</i>	<i>Indiziert</i>
<b>Schleifendiuretika</b>		Bei Flüssigkeitsretention	<i>indiziert</i>	<i>indiziert</i>
<b>Herzglykoside</b>	Bei Tachyarrhythmie	Bei Tachyarrhythmie/ bei persistierenden Symptomen unter ACE-Hemmer und Diuretika	<i>indiziert</i>	<i>indiziert</i>

-  Prognoseverbessernd
-  Symptomatisch unterstützend
-  Herzglykoside: galten früher als symptomatisch unterstützend, laut neueren Studien dosisabhängiger prognoseverbessernder Effekt von Digoxin

**Abbildung 3: Stufenschema der medikamentösen Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. (modifiziert nach [3, 40])**

Zu den prognoseverbessernde Medikamenten gehört als erstes der ACE -Hemmer. Dieser ist in allen NYHA-Stadien einzusetzen und vermindert die Angiotensin II-Bildung, wodurch diese Substanzklasse den systemischen Widerstand und somit die Nachlast senkt. [1, 2, 41-45] ACE-Hemmer wirken zusätzlich kardioprotektiv, indem sie das Remodeling am Myokard reduzieren. [3, 4, 46]. Außerdem senken sie die Natrium- und Wasserretention und verringern dadurch die Vorlast und den Sympathikotonus. Ebenso wird durch ACE-Hemmer der lokale Abbau von Bradykinin am Gefäßendothel gehemmt, was so zu den unerwünschten Nebenwirkungen wie Reizhusten und angioneurotisches Ödem führt. [1, 3] Unter 4.3. wird die Wirksamkeit und die Nebenwirkungen der ACE-Hemmer ausführlich diskutiert. Bei Kontraindikation für einen ACE-Hemmer oder bei durch diesen verursachten Nebenwirkungen, erfolgt der Einsatz von Angiotensin<sub>1</sub>-Rezeptorblockern ebenfalls ab NYHA I, welche eine nebenwirkungsärmere Alternative zu ACE-Hemmern darstellen. Die



Wirkweise entspricht derjenigen von ACE-Hemmern. Jedoch wird der AT<sub>1</sub>-Rezeptor direkt gehemmt, sodass keine Interferenz mit dem Bradykininabbau entsteht. [3, 47-51]

Um dessen neueste Weiterentwicklung mitabzubilden, soll hier noch die Gruppe der Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitoren (ARNI) vorgestellt werden: Momentan ist das sogenannte Entresto® (Sarcubitril/Valsartan) auf dem Markt erhältlich, welches für die systolische Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) in den NYHA-Stadien II-IV zugelassen ist. [40] Sarcubitril hemmt Neprilysin, eine neutrale Endopeptidase via LBQ657. [40, 52] Valsartan wiederum hemmt auf bekannte Art und Weise den AT<sub>1</sub>-Rezeptor und zusätzlich die Effekte von LBQ657. [40] Neprilysin wiederum hydrolysiert die natriuretischen Peptide wie ANP, BNP und auch Bradykinin. [52] Die Kombination von ACE-Hemmer und ARNI ist kontraindiziert. [40] ARNI sollten bei Patienten mit HFrEF, die trotz optimaler Therapie mit ACE-Hemmer,  $\beta$ -Blocker und Aldosteronantagonisten symptomatisch bleiben, den ACE-Hemmer ersetzen. [5]

Ab NYHA II sind zusätzlich, da ebenfalls prognoseverbessernd,  $\beta$ -Blocker indiziert. Bei Patienten mit Hypertonie oder nach Herzinfarkt sind sie bereits ab NYHA I indiziert. [1-3, 41, 53-56]  $\beta$ -Blocker wirken negativ chrono-, dromo-, ino- und bathmotrop, das heißt sie reduzieren den Sauerstoffverbrauch, wirken rhythmusstabilisierend und schirmen die Myokardzellen vor dem überaktiven Sympathikus ab. [1]

Aldosteronantagonisten wie Spironolacton sind ebenfalls prognoseverbessernd und werden ab NYHA II eingesetzt. Bei ihrem Einsatz ist die Kontrolle des Serumkaliums wichtig. [1, 3, 57, 58]

Symptomatisch unterstützend wirken alle anderen Diuretika, welche ab NYHA III eingesetzt werden, beziehungsweise bei Flüssigkeitsretention und nach Myokardinfarkt schon ab NYHA II. [3]

Die Einnahme von Herzglykosiden (Digitalis, Digitoxin) erfolgt ab NYHA Stadium III, sowie stadienunabhängig bei Tachyarrhythmie bei Vorhofflimmern. [3] Herzglykoside wirken vor allem positiv inotrop. Sie zählten früher ebenfalls zu den symptomatischen Therapeutika, laut neueren Studien gibt es einen dosisabhängigen, prognoseverbessernden Effekt von Digoxin. [4]

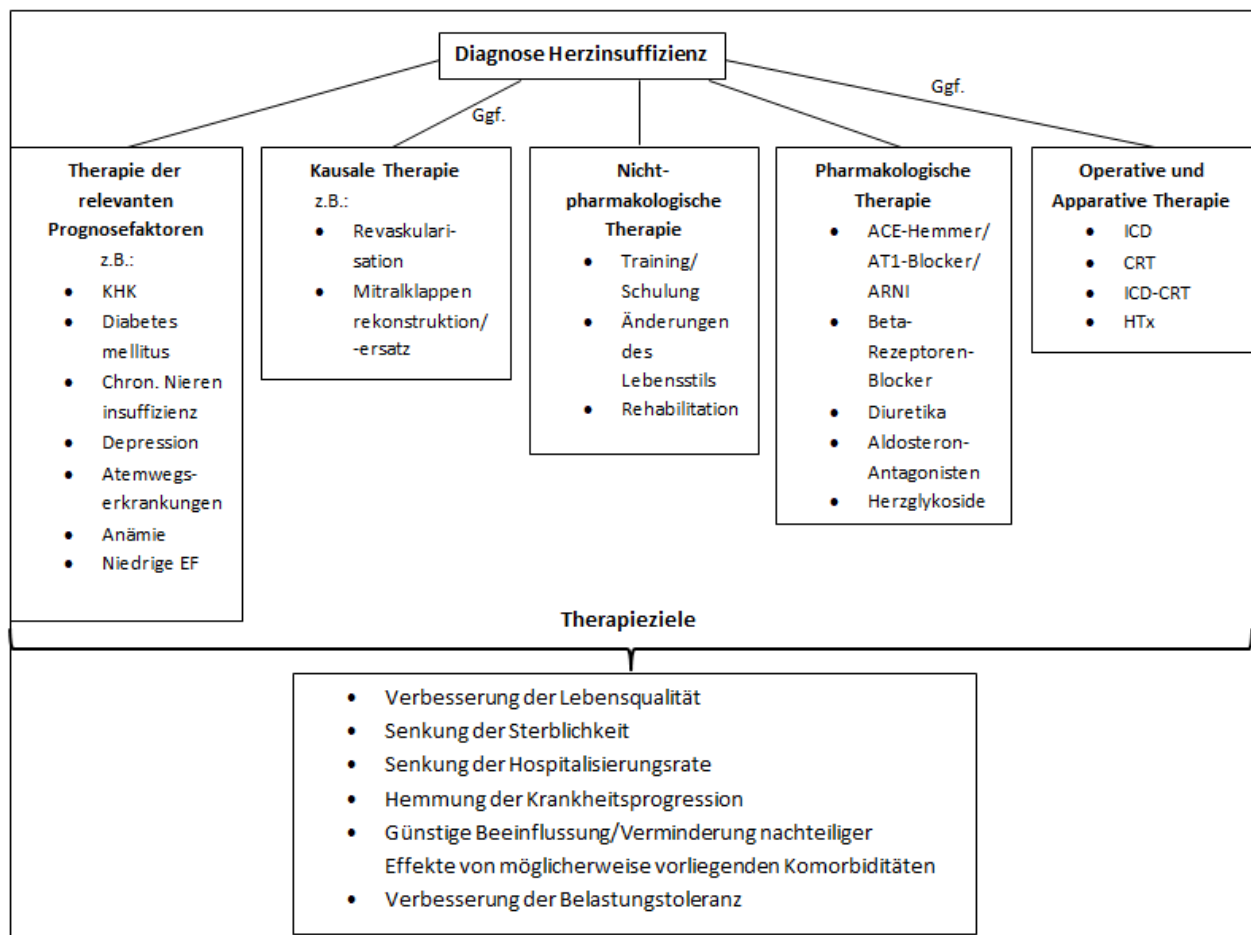
Nicht unerwähnt bleiben sollen die apparativen Maßnahmen, die ergriffen werden können, um den Herzmuskel zu unterstützen und damit die Prognose der Patienten zu verbessern. [3, 33, 59-63] Durch die Optimierung der myokardialen Kontraktionsabläufe mittels vorhofgesteuerter biventrikulärer Elektrostimulation, lässt sich die Pumpleistung durch eine kardiale Resynchronisationstherapie (CRT) verbessern. [1, 3]

Eine weitere apparative Therapiemöglichkeit ist der implantierbare Kardioverter-Defibrillator (ICD), welcher am effektivsten gegen ventrikuläre Rhythmusstörungen wirkt.

Bei schwer symptomatischen Patienten, die alle Kriterien erfüllen, kann die Implantation eines kombinierten CRT-ICD Systems erwogen werden. [1]

Zuletzt besteht die Möglichkeit der Herztransplantation als Ultima ratio.

Um die Zeit bis zur Transplantation zu überbrücken, besteht die Möglichkeit des Einsatzes von sogenannten Assist Devices, welche mechanische Unterstützungssysteme des Herzens, vor allem des linken Ventrikels darstellen. [3]



**Abbildung 4: Aktueller Therapie-Algorithmus der chronischen Herzinsuffizienz nach der nationalen Versorgungsleitlinie. [modifiziert nach 1]**

### **1.1.7 Prognose**

Die Prognose einer unbehandelten manifesten Herzinsuffizienz ist meist ungünstig: die 1-Jahresletalität in Abhängigkeit vom NYHA-Stadium beträgt im Stadium I unter 10 %, während sie im Stadium II schon 15 % beträgt. Im Stadium III steigt die 1-Jahresletalität dann auf 25 %, im Stadium IV liegt sie sogar bei 50 %. [3] Unter leitliniengerechter, konservativer Therapie lässt sich die Prognose um etwa 50 % verbessern, die 10-Jahresüberlebensrate nach Herztransplantation beträgt sogar bis zu 70 % bei einer Absterberate von 3 %/Jahr. [3] Die häufigste Todesursache bei an chronischer Herzinsuffizienz Erkrankten ist der plötzliche Herztod durch Kammerflimmern. [3] In Anbetracht dieser sogar im Vergleich zu Tumorerkrankungen schlechten Gesamtprognose, trotz der aktuell vorliegenden Vielfalt an therapeutischen Möglichkeiten, ist es von großer Wichtigkeit weiter an neuen Therapieoptionen zu forschen. An dieser Stelle steht unter anderem die Gruppe der miRNAs, welche im Folgenden vorgestellt werden soll, im Interesse der Forschung. Denn die systolische Herzinsuffizienz ist zwar multifaktoriell, hat jedoch in der Regel drei Hauptaspekte: eine eingeschränkte Pumpfunktion, vermehrte Fibrose und unter Umständen eine verminderte Mikrozirkulation. Eine molekulare Therapie die diese Aspekte antagonisiert, scheint daher aussichtsreich. Dies macht die Inhibition von miRNAs attraktiv, da diese oft mehrere Angriffspunkte auf einmal vorweisen können.

## **1.2. Molekularbiologische Grundlagen**

### **1.2.1. miRNA**

Micro-RNAs sind kleine, nicht- kodierende, einzelsträngige RNA Moleküle von etwa 19-25 Basenpaaren (bp) Länge, welche phylogenetisch hoch konserviert und post-transkriptional an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Sie werden zunächst als lange Primärtranskripte von inter- und intragenomischen Regionen durch die RNA-Polymerase II transkribiert und anschließend wird die etwa 60-100 bp lange Vorläufer-miRNA unter anderem von den Enzymen Drosha, DGCR8 und Dicer prozessiert. Hierbei entsteht die reife, 22 bp lange miRNA, welche mRNA durch eine konservierte (6-8 bp lange) Startsequenz mittels Watson-Crick-Basenpaarung bindet. [64, 65] Als Endonuklease ist Drosha verantwortlich für die Entstehung der prä-miRNA, indem sie die Primärtranskripte auf die Länge der Vorläufer-miRNAs zuschneidet. [66] Drosha ist als Mikroprozessor-Komplex mit diversen Polypeptiden assoziiert, von denen sich in *in-vitro* Experimenten gezeigt hat, dass sie

unabdingbar für eine korrekte Funktion von Drosha ist. [67] Einer dieser Co-Faktoren ist oben erwähnter DGCR8: er stabilisiert die Drosha-Expression und fördert eine akkurate Spaltung der pri-miRNAs. [66] Sobald die prä-miRNAs generiert worden sind, werden sie in das Zytoplasma transportiert, wo die Ribonuklease Dicer für die weiteren Regulationsmechanismen verantwortlich ist: Dicer kürzt nun die etwa 70 bp lange prä-miRNA auf ihre reife Form von etwa 22 bp. [66] Die korrekte Funktion von Dicer ist essentiell für die Aufarbeitung nahezu aller prä-miRNAs, so dass Dicer-Null-Mutationen in Mäusen zu einem embryonal letalen Phänotyp führen. [68] Darüber hinaus ist Dicer nicht nur an der Fetalentwicklung maßgeblich beteiligt, sondern auch an multiplen physiologischen und pathologischen Zellprozessen in erwachsenen Individuen. [66] Zusätzlich verbindet sich Dicer mit anderen Proteinen, um den sogenannten RISC (RNA-induced Silencing Complex) zu formen. [66] Dieser dient im Verbund mit einer reifen miRNA dazu, eine gewünschte Ziel-mRNA post-transkriptional zu regulieren, indem sie entweder abgebaut wird oder post-translational inhibiert wird. [69, 70] Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Entstehungsprozess der miRNAs selbst eine komplexe Angelegenheit mit diffizilen Interaktionen diverser Co-Faktoren ist und dementsprechend großen Einfluss auf die Regulation der miRNAs hat.

Mehr als 30 % des Protein-kodierten Teils des menschlichen Genoms werden durch miRNAs reguliert. [70] Durch die Fähigkeit der miRNAs, sowohl an perfekt passende, als auch an nicht völlig komplementäre Ziel-mRNAs zu binden, kann eine einzelne miRNA funktionell als Transkriptionsfaktor Bedeutung erlangen, da sie auf diese Weise nicht nur einzelne Gene reguliert, sondern Genexpressionsmuster moduliert. [64] Bis zu 200 mRNAs können auf diese Art von einer miRNA inhibiert werden. [71]

Nachdem die Bedeutung von Micro-RNAs zunächst auf dem Gebiet der Krebsforschung, viralen Krankheiten und entwicklungsbiologischen Prozessen nachgewiesen wurde, legen neuere Erkenntnisse nahe, dass sie auch ein wichtiger Teil von Regulationsprozessen bei der kardialen Entwicklung, sowie kardiovaskulären Erkrankungen wie der Hypertrophie sind. [66, 72-77]

Hierbei kann man die miRNAs einteilen in Antagonisten und Agonisten vornehmlich der kardialen Hypertrophie, sowie in Akteure vorrangig in Fibroblasten beziehungsweise Endothelzellen. [66]

Nicht zuletzt sind diejenigen miRNA-Profile von Interesse, welche in einem insuffizienten Herzen verändert reguliert werden und damit Genexpressionsprofile auf ihr fetales Expressionsmuster zurücksetzen. [72] Die Übereinstimmung zwischen den Veränderungen

der miRNA-Expression in einem versagenden und einem fetalen Herzen ist eklatant. In einer Studie von Thum *et al.* [72] wurden beispielhaft drei fetale miRNAs (miRNA-21, -129, -212) in neonatalen Kardiomyozyten überexprimiert, was zu morphologischen Veränderungen ähnlich wie in insuffizienten Herzen führte. Genauso kam es bei einer Überexpression dieser miRNAs in adulten Herzmuskelzellen zu zellulärer Hypertrophie und einer Aktivierung des fetalen Genprogramms. [72]

Zunächst zu denjenigen miRNAs, welche bei einer pathologischen kardialen Hypertrophie als Antagonisten agieren:

miRNA-1 zählt zu den kardial am höchsten exprimierten miRNAs. Dies deutet bereits darauf hin, dass sie eine spezifische Rolle in der Morphologie und Funktion von Kardiomyozyten spielt. [70, 78, 79] Die Komplexität der Regulation und Funktion von miRNAs wird bereits an dieser ersten miRNA deutlich: während der Entwicklung des Herzens führt eine Überexpression von miRNA-1 zu dilatierten Ventrikeln und Herzinsuffizienz, [80] wohingegen beim erwachsenen Herzen die Überexpression von miRNA-1 eine kardiomyozytäre Hypertrophie abschwächt. [71, 81, 82] Die Herunterregulation dieser miRNA ist demzufolge maßgeblich bei der Pathogenese der kardialen Hypertrophie. [66]

miRNA-1 ist Teil einer bicistronischen Gruppe im Herzen, welche für miRNA-1, miRNA-133a-1/miRNA-1-2 und miRNA-133a-2/miRNA-1-1 kodieren. [80] Die Überexpression von miRNA-133 führt ebenfalls zur Abschwächung einer Agonisten-induzierten kardialen Hypertrophie, [82, 83] während die Inhibition dieser miRNA (vgl. 1.2.2.) das Myokard für exzessives Wachstum sensibilisiert. [66] Ein genetischer Mangel sowohl an miRNA-133a-1 als auch miRNA-133a-2 resultiert in extensiver kardialer Fibrose und beeinträchtigter kardialer Funktion. [66] Ebenso werden auch miRNA-26 und miRNA-98 bei kardialer Hypertrophie herunterreguliert, während ihre Überexpression das Wachstum der Kardiomyozyten abschwächt. [66] miRNA-9 stellt sich ebenfalls als Negativ-Regulator der kardialen Hypertrophie dar, indem sie die Expression von Myocardin, einem transkriptionalen Co-Faktor welcher die kardiale Hypertrophie stimuliert, abschwächt. [66]

Bereits erwähnt wurden auch die Agonisten der kardialen Hypertrophie. Hierzu zählt unter anderem miRNA-195, welche zuerst als Hypertrophie auslösende miRNA im erwachsenen Herzen charakterisiert wurde. [84] Die Überexpression von miRNA-195 induziert in den neonatalen Kardiomyozyten von Ratten eine Hypertrophie und führt *in vivo* zu einer dilatativen Kardiomyopathie und kardialer Dysfunktion. [84, 85] Auf konkordante Art und Weise beeinflusst miRNA-499 das kardiale Wachstum. [66] Die Inhibition von miRNA-199b *in vivo* führt zu einer deutlichen Abnahme von Hypertrophie und Fibrose in Mausmodellen

zur Herzinsuffizienz. [66] In einem Mausmodell der Herzinsuffizienz durch Drucküberlastung demonstrierten Rane *et al.* [86] eine Heraufregulation von miRNA-199a-5p. miRNA-23a wird ebenfalls bei durch Drucküberlastung induzierter Hypertrophie vermehrt exprimiert. [66] Darüber hinaus sind die miRNAs-100, -92 und -18b ebenfalls als Agonisten an der Entstehung einer pathologischen Hypertrophie beteiligt. [87]

Als Teil der evolutionär konservierten miRNA-212/132-Familie ist die miRNA-132 ebenfalls stark mit kardialer Hypertrophie assoziiert. [65] Unter hypertrophischen Stimuli wird die Expression dieser miRNA-Familie *in vitro* und *in vivo* in Mäusen induziert. [65] Ucar *et al.* [65] stellten in einem transgenen Mausmodell dar, dass die Überexpression von miRNA-212/132 in Kardiomyozyten zu kardialer Hypertrophie führt. Dies wird anhand der Analyse von kardialen Stress-Markern, wie ANP, BNP und  $\beta$ -MHC, welche drastisch erhöht waren, deutlich. Darüber hinaus wurde in der gleichen Studie gezeigt, dass miRNA-212/132 benötigt wird, um überhaupt kardiale Hypertrophie in Mäusen generieren zu können. [65] Daher waren Mäuse, die durch eine künstlich erzeugte Mutation eine miRNA-212/132-Defizienz auf beiden Allelen besaßen, vor TAC-induzierter Hypertrophie geschützt. [65] Des Weiteren wiesen diese Tiere weniger TAC-erzeugte Fibrose als Wildtyp-Tiere auf. Insgesamt lässt sich also feststellen, dass die miRNA-212/132-Familie bei Überexpression nicht nur ausreicht, um kardiale Hypertrophie zu induzieren, sondern auch eine Voraussetzung dafür ist. [65] Dadurch scheint die Inhibition von miRNA-132 ein potentiell interessanter Ansatz zur Verhinderung der kardialen Hypertrophie zu sein. [65]

Das physiologische Wachstum des Herzens ist ebenfalls von Bedeutung, deshalb soll hier ein kurzer Überblick über die daran beteiligten miRNAs gegeben werden. Zirkulierende miRNAs zeigten ein distinktes Muster als Reaktion auf sportives Training: miRNA-146a und miRNA-222 waren durch akuten Sport vor und nach Ausdauertraining heraufreguliert, miRNA-21 und miRNA-221 wurden nur nach akutem Training und nicht durch Ausdauertraining in ihrem Niveau erhöht. miRNA-20a reagierte nur auf Ausdauertraining, während miRNA-133a, -210 und -328 weder auf akutes Training noch auf Ausdauersport eine Veränderung zeigten. [88, 89]

Nicht nur die Dysregulation von Kardiomyozyten ist ausschlaggebend für die Entstehung einer Herzinsuffizienz, ebenso kommt es zu modifizierten Regulationsmustern von miRNAs in Fibroblasten. Eine davon ist die miRNA-29, welche simultan mehrere Zielgene regulieren kann, unter anderem Elastin, Kollagene und Fibrilline. [66, 90] Thum *et al.* [91] zeigten, dass die Expression von miRNA-21 im versagenden Myokard vor allem in Fibroblasten stark induziert wird. Durch die Inhibition dieser miRNA *in vivo* konnte eine kardiale Dysfunktion

im Mausmodell durch Pressure-Overload verhindert werden. [91] Die Effekte von miRNA-21 sind jedoch noch vielfältiger, auch eine Wirkung in Kardiomyozyten konnte dargestellt werden: der Komplementärstrang miRNA-21\* zeigt Potential als parakriner Signalmediator im Hinblick auf Fibroblasten-induzierte kardiomyozytäre Hypertrophie [92]. Die Transfektion von Kardiomyozyten mit einem miRNA-21\*-Vorläufer führt zu einer signifikant höheren Zellgröße, während die Transfektion mit miRNA-21 in dieser Hinsicht keinen Effekt zeigte [92]. Festzuhalten ist, dass die miRNA-21 nicht nur direkt Einfluss auf die molekularen Regulationsmechanismen des Herzens hat, sondern auch indirekt [92]: zum Beispiel die Wirkung auf Herzmuskelzellen via Fibroblasten. Auch die während ihrer eigenen Stoffwechselprozesse beteiligten Partner, so zum Beispiel oben aufgeführter Komplementärstrang, besitzen eigenes Einflussvermögen auf kardiales Zellwachstum. Um also allen Wirkmechanismen der miRNA-21 auf die Spur zu kommen, ist es notwendig auch ihre zunächst als Abbau- oder Nebenprodukte vernachlässigten Stoffwechselzwischenprodukte in die Gleichung mit einzubeziehen.

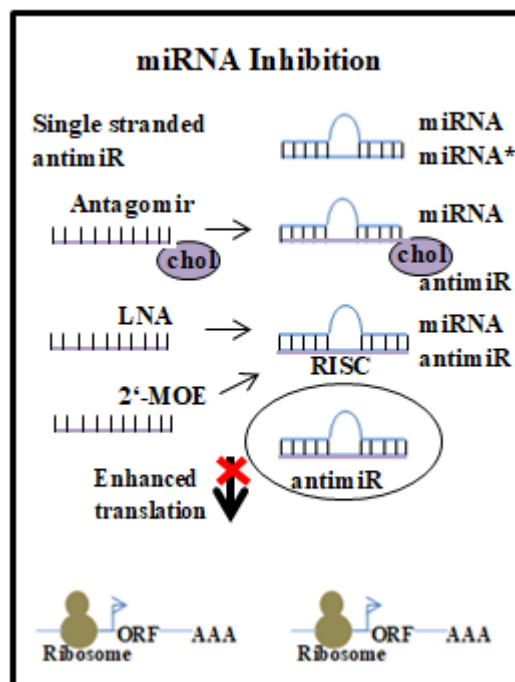
In einer Arbeit von Kumarswamy *et al.* [93] wurde der Einfluss der miRNA-212-Familie auf Endothelzellen und die Angiogenese untersucht. Die Autoren konnten zeigen, dass eine Inhibition von miRNA-212 die endotheliale Migration und die Formation von Kapillaren selbst unter Stressoren aufrechterhalten konnte, wohingegen die Inhibition von miRNA-132 in dieser Situation nicht den gleichen Effekt zeigte. [93] Dies deutet darauf hin, dass die beiden miRNAs trotz ihrer Zugehörigkeit zu einer Familie aufgrund der gleichen Keimsequenz, nicht den gleichen Einfluss auf das Endothel haben. [93] Verantwortlich hierfür ist unter anderem eine zusätzliche miRNA-Bindesequenz, die in miRNA-212 integriert ist, nicht aber in miRNA-132. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Aktivierung der miRNA-212/132 Familie von miRNA-30a-3p abhängig ist. [93] Die Inhibition dieser pro-angiogenetischen miRNA [94] führte zu einer Überexpression von miRNA-212/132. [93] Eine Deletion von miRNA-212/132 durch Knockout-Mäuse führte zu einer Verbesserung der Endothelfunktion, sowie zu einer erhöhten Kapillardichte und Angiogenese *in vivo*. [93] Die Untersuchungen von Kumarswamy *et al.* zeigten, dass vor allem miRNA-212 einen großen Einfluss auf die endotheliale Funktion hat, während miRNA-132 immerhin marginale Effekte aufweist. [93]

### **1.2.2. miRNA-Inhibitoren**

Die nachgewiesene Dysregulation von miRNAs in verschiedenen Krankheitsbildern führt in der Konsequenz zur Möglichkeit der Inhibition derselben, um so potentiell diese

Krankheitsbilder therapeutisch zu modulieren.

Es gibt verschiedene Methoden um letztendlich die Translation einer bestimmten miRNA gezielt in vivo zu hemmen. Chemisch modifizierte, einzelsträngige, gegenläufig komplementäre Oligonukleotide können einerseits an die reife miRNA binden und als kompetitiver Inhibitor agieren, andererseits können sie auch an die Vorläufer-miRNA binden und so deren Prozessierung verhindern. [31] Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass diese anti-miR genannten Oligonukleotide die Weiterverarbeitung oder den Transport der Vorläuferstufen der miRNAs aus dem Zellkern störend beeinflussen. [31]



**Abbildung 5: verschiedene Möglichkeiten zur Inhibition von miRNA. (modifiziert nach [31])**

Die perfekte Komplementarität der AntimiR-Oligonukleotid-Sequenz mit der entsprechenden miRNA erlaubt ihnen, an ihre Ziel-miRNA zu binden und ihre Funktion zu beeinflussen.

Es sind verschiedene Arten von AntimiRs bekannt: die älteste AntimiR-Klasse ist das Antagomir, ein cholesterinmodifiziertes 2'-O-methyl-phosphothioat Antisense Oligonukleotid. [95] Es inhibiert miRNAs kompetitiv, indem er sich an den reifen miRNA Leitstrang anlagert, nachdem der RISC den Folgestrang entfernt hat. [95]

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit einen gesamten miRNA-Signalweg zu blockieren. [31] Dies wird erreicht durch das Beseitigen der gewünschten miRNA, die verhindert, dass sie an ihr jeweiliges mRNA-Ziel bindet. [96] Sharp und Kollegen berichteten bereits 2007 über sogenannte miRNA Sponges, welche die Reduktion des miRNA-Niveaus induzierten. [95]

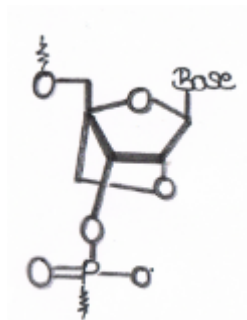


Bei dieser Technik wird eine Serie von entweder perfekt oder imperfekt gepaarten Bindestellen für eine spezifische miRNA an die 3'-UTR (untranslated region) der Expressionskassette eines Reportergens eingeführt. [31, 95]

Die gebündelten Bindestellen fungieren als kompetitive Inhibitoren und besetzen die natürlichen, auf die spezifischen miRNAs programmierten RISCs. [31] Dies reduziert effektiv die Konzentration der programmierten RISCs die für eine Bindung an ihr natürliches Ziel zur Verfügung stehen, wodurch der inhibitorische Effekt einer spezifischen miRNA auf ihre Ziel-mRNAs nachlässt. [31] Anstatt also einzelne Mitglieder einer miRNA-Familie gesondert zu inhibieren, werden durch die Sponges alle Mitglieder einer miRNA-Familie auf einmal beseitigt, da deren gleiche Bindungsstellen von den Sponges erkannt werden. [31]

Darüber hinaus existieren Inhibitoren, welche chemisch durch die Locked Nucleic Acid (LNA) Thiophosphat Modifikation gekennzeichnet sind, sowie die 2'-O-methoxyethylphosphorothioat (MOE) Veränderung der AntimiR-Oligonukleotide.

Die LNA, welche ein Nukleinsäureanalogon mit beispiellosen Hybridisierungsmöglichkeiten auf komplementäre DNA und RNA ist, stellt eine weitere Möglichkeit der miRNA-Inhibition dar. [97, 98] Sie ist definiert als Oligonukleotid, welches ein oder mehrere LNA-Monomere enthält. Jene sind konstruiert als 2'-O,4'-C-methylen- $\beta$ -D-ribofuranosyl Monomere, das heißt die Grundstruktur der Ribose wird durch eine Methylen-Brücke, welche das 2'-Sauerstoff-Ende mit dem 4'-Kohlenstoff-Ende verknüpft, verändert. [97, 98]



**Abbildung 6: LNA-Molekül. (modifiziert nach [99])**

Charakteristisch für die LNA ist ihre enge strukturelle Ähnlichkeit zu nativen Nukleinsäuren, die unter anderem zu einer sehr guten Löslichkeit in Wasser und einer einfachen Handhabung führt. [97] Eine automatisierte Herstellung ist genauso möglich, wie das Einschleusen in Zellen mittels standardisierten Protokollen. Die Transfektion wird über kationische Transfektionsreagenzien durch den geladenen Phosphathauptstrang in der Molekülstruktur

ermöglicht. [97] LNAs sind vielseitige und hochaffine Werkzeuge, um hochpräzise einzelsträngige DNA und RNA zu erkennen. [97, 98] Um Oligonukleotide als Inhibitoren auf molekularer Ebene verwenden zu können, ist eine erhebliche Serumstabilität nötig, was bereits durch die Einführung von zwei oder drei terminalen LNA Monomeren in einen DNA-Strang erreicht wird. [97, 98] Damit ist eine wichtige Grundvoraussetzung für den therapeutischen Einsatz von LNA bereits geschaffen. [97] Bisher sind drei verschiedene Arten, durch die LNA inhibierend wirkt, beschrieben: als RNase H (endonukleolytische Spaltung von RNA-Strängen), mittels sterischem (räumlichem) Block und über die Inhibition des Splicens (RNA-Prozessierung zur reifen mRNA). [97] Darüber hinaus ist in klinischen Studien bis dato über eine nur geringe Toxizität berichtet worden. [98]

Im vorliegenden Modell wurde mit LNA-132 als miRNA-Inhibitor gearbeitet.

Die Nukleotid-Kernsequenz der reifen miRNA-132 ist im Mensch und in der Maus gleich [100-107]: 5' - UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG - 3'.

Die Nukleotid-Sequenz der verwendeten LNA-132 nach Thum *et al.* [108] lautet:

5' - CGACCAUGGCUGUAGACUGUUA - chol - 3', wobei das „chol“ für Cholesterin steht.

### **1.3. Etablierte Modelle der Herzinsuffizienz**

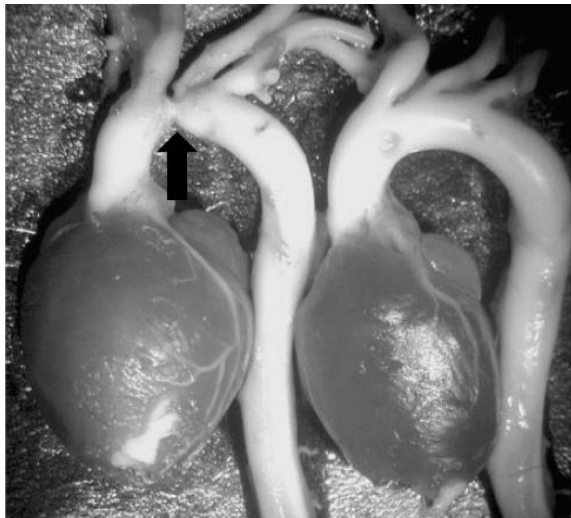
In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Modell der hypertrophen Herzinsuffizienz etabliert. Derzeit existieren für dieses Krankheitsbild Klein- und Großtiermodelle. Zu den Kleintiermodellen gehören vor allem Maus- und Rattenmodelle, während die Großtiermodelle vor allem an Schweinen, aber auch an Hunden und Schafen durchgeführt werden. [109-111] Die Notwendigkeit von Tiermodellen in der Evaluation der Ursachen, klinischen Eigenschaften und potentiellen therapeutischen Strategien eines Krankheitsbildes ist unter anderem dadurch gegeben, dass adäquate Therapiemöglichkeiten für gewöhnlich erst im Tiermodell überprüft werden müssen. Dies ist notwendig um pathophysiologische Mechanismen, potentielle Nebenwirkungen und Risiken aufzuklären, sowie adäquate Dosierungen festzulegen, bevor Therapeutika in klinischen Studien untersucht werden. [109, 112]

Die ersten Tiermodelle der Herzinsuffizienz wurden in Ratten entwickelt, unter anderem weil die Haltungskosten sehr viel niedriger sind als für Großtiere. Die neuesten technischen Entwicklungen in Bezug auf Echokardiographie, MRT und Mikromanometer-Conductance Katheter haben die Erfassung der kardialen Funktion in Nagetieren erheblich vereinfacht. Die

chirurgische Expertise und Erfahrung, welche man erwerben muss, um Operationen am offenen Thorax des Versuchstiers, beziehungsweise invasive hämodynamische Messungen durchzuführen, ist in Ratten weniger anspruchsvoll als in Mäusen. [111] Zusätzlich ist durch die etwa 10-fach größere Herzmasse von Ratten eine größere Anzahl von histologischen oder molekularbiologischen Analysen postmortem möglich. [111] Es gibt verschiedene Modelle der Herzinsuffizienz in der Ratte, unter anderem das der Koronarligatur [113] und genetische Modelle der Hypertension mit konsekutiver Herzinsuffizienz (Dahl salt-sensitive rat / spontaneously hypertensive heart failure-prone rat). [111, 114, 115] Jedoch ist festzustellen, dass invasive kardiologische Messungen nur einmal möglich sind und es darüber hinaus nur relativ wenige transgene Modelle im Vergleich zur Maus gibt. [111]

In Bezug zur vorliegenden Arbeit sind die Modelle der Herzinsuffizienz durch Pressure-Overload, also durch Drucküberlastung am meisten von Interesse. Hierzu existiert eine Vielzahl an operativen Methoden um diese Drucküberlastung zu induzieren. Am verbreitetsten ist jedoch das Banding der Aorta ascendens. Bei dieser Form wird eine Ligatur um die Aorta ascendens von 3-4 Wochen alten Ratten gelegt, wodurch diese im Laufe ihres Wachstums graduell mehr Pressure-Overload entwickeln. [111] Ein besonders hervorzuhebender Vorteil bei dieser Art der Drucküberlastung ist, dass sie graduell zunimmt, sodass auch der Übergang von kompensierter Hypertrophie zu dekompenziertem Herzversagen fließend ist. Dadurch wird dieses Modell potentiell klinisch relevanter im Hinblick auf die ähnliche Progression der Herzinsuffizienz im Menschen. [111]

Auch in Mäusen existiert eine Vielzahl von Herzinsuffizienzmodellen, die Vorteile ähneln im Prinzip jenen der Rattenmodelle (geringe Kosten bei größeren Versuchstierzahlen, große Zahl an verschiedenen Untersuchungsmodalitäten), hervorzuheben ist jedoch die Verfügbarkeit einer großen Anzahl von transgenen und knock-out Züchtungen. Darüber hinaus sind die Haltungskosten für Mäuse sogar noch geringer als für Ratten. [111] Bei den Mausmodellen ist neben diversen anderen Modellen zur Erzeugung einer Herzinsuffizienz, wie dem Ischämie-Reperusionsmodell oder den genetischen Modellen, vor allem das Modell der Drucküberlastung (TAC = transverse aortic constriction) von Interesse. [65, 112] Es wurde zuerst von Rockman *et al.* [116, 117] beschrieben und hat den großen Vorteil, dass es möglich ist den Druckgradient über der Aortenstriktur zu quantifizieren. [111]



**Abbildung 7: Transverse aortic constriction (TAC) Modell in der Maus. (modifiziert nach [118])**

Im Unterschied zu dem oben beschriebenen Pressure-Overload-Modell der Ratte tritt hier jedoch die Drucküberlastung sehr plötzlich ein. [111] Hieraus resultiert innerhalb kurzer Zeit eine linksventrikuläre Hypertrophie, was dieses Modell zu einer exzellenten Wahl macht, möchte man pharmakologische oder molekulare Interventionen untersuchen, welche anti-hypertroph wirken. [111]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Modelle in der Ratte eher zur Erprobung neuer pharmakologischer oder molekularer Agenzien für die Therapie der Herzinsuffizienz geeignet ist, während die Mausmodelle, insbesondere die transgenen, vor allem für die Grundlagenforschung geeignet sind, besonders für die Identifikation wichtiger Gene oder Proteine als Baustein von neuen molekularen oder pharmakologischen Substanzen. [111]

Signifikante Unterschiede zwischen Mensch und Maus existieren jedoch vor allem was die Herzfrequenz, den Sauerstoffverbrauch, die Verteilung von Adrenorezeptoren und die Reaktion auf den Verlust von regulatorischen Proteine betrifft. [110]

Auch die Expression kontraktiler Proteine ist speziesspezifisch, was anhand der vorherrschenden Myosin-Isoformen belegbar ist. [110] Nicht zuletzt zeigt sich ein signifikant unterschiedlicher Phänotyp zwischen Stammzellen von Mäusen und Menschen. [110]

Großtiermodelle hingegen sind durch eine große Übereinstimmung das Verhältnis Herz-/Körpergewicht und das gesamte Herzkreislaufsystem betreffend, prädestiniert für die kardiovaskuläre Forschung. Insgesamt ähnelt die Physiologie, Funktion und Anatomie von Großtieren der des Menschen sehr. [109, 110]

Besonders das Schwein ist als Modell in der Herzkreislaufforschung von großem Interesse, da es wie der Mensch wenig präformierte Kollateralen aufweist und die koronararterielle Anatomie von größtmöglicher Ähnlichkeit mit derjenigen des Menschen ist. [110] Darüber

hinaus hat das Schwein als Großtiermodell vor allem den Vorteil, dass auch viele molekularbiologische und andere physiologische, myokardiale Prozesse denjenigen im Menschen sehr nahe sind. [109] Das Myokard des Schweineventrikels exprimiert auf nahezu demselben Niveau wie das des Menschen das Molekül  $\beta$ -Myosin Heavy Chain ( $\beta$ -MHC). [109] Die Herzfrequenz ist in Ruhe beim Schwein nur geringfügig höher als beim Menschen, ebenso der LVP. [109, 119, 120] Ebenso wie der Mensch, hat auch das Schwein eine große funktionelle Reserve in Bezug auf die Herzfrequenz. [109, 121] Darüber hinaus haben auch Schweine eine positive Kraft-Frequenzbeziehung, wie oben als Bowditch-Effekt beschrieben wurde. [109]

In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Modell der Herzinsuffizienz im Schwein durch Drucküberlastung, das sogenannte pTAC-Modell analysiert, wobei diesem Modell alle oben genannten Eigenschaften von Schweinemodellen zu Gute kommen.

## **1.4. Fragestellung**

In der hier vorliegenden Doktorarbeit wurde erstmals ein perkutanes Modell der kardialen Hypertrophie am Schwein etabliert.

In diesem Modell wurde folgende Fragestellung untersucht:

1. Inwieweit wirkt sich die akute Druckbelastung im chronischen Verlauf auf die globale Herzleistung und Druckentwicklung aus.
2. Inwieweit zeigt der MicroRNA-Inhibitor LNA132 eine antagonisierende Wirkung auf die pTAC induzierte kardiale Hypertrophie.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. In-vivo Experiment

#### 2.1.1. Versuchstier: Deutsches Landschwein

Alle Versuchstiere der Rasse Deutsches Landschwein wurden nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes gehalten. Die Studie wurde von der Regierung Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 141-11). Die Versuchstiere wurden im Walter-Brendel-Zentrum in Großhadern gehalten, wo sie durch ausgebildete Versuchstierpfleger betreut wurden. In den dortigen Räumlichkeiten erfolgten mit Unterstützung des Instituts auch die Versuche. Die Tiere waren männlich, kastriert, zu Versuchsbeginn drei Monate alt und etwa 20 Kilogramm schwer. An Tag 28 betrug das Gewicht im Durchschnitt 45 Kilogramm und an Tag 56 durchschnittlich 85 Kilogramm.

Die Gruppenstruktur der Versuchstiere wird aus nachfolgender Tabelle ersichtlich:

Gruppe	sham	pTAC	pTAC/LNA-132	pTAC/LNAscr
n =	6	6	6	6

#### 2.1.2. Versuchsdurchführung

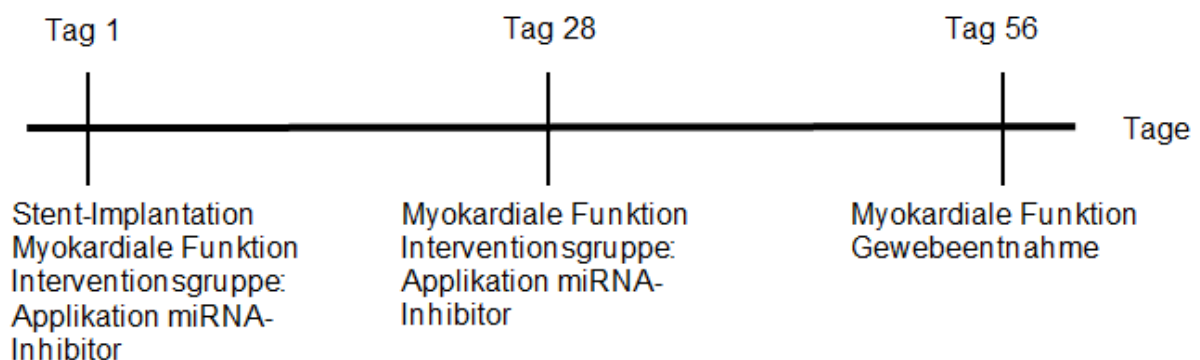


Abbildung 8: Darstellung des Versuchsablaufs über 56 Tage im pTAC-Modell im Schwein.

Die Versuchstiere erhielten vor Versuchstag 1 (day 0) über drei Tage hinweg insgesamt 300 mg Clopidogrel (Plavix 75 mg, Bristol-Myers Squibb, New York, USA) als Loading Dose und während der ersten vier Wochen eine Erhaltungsdosis von 75 mg täglich. Die Narkose wurde an allen Versuchstagen durch eine intramuskuläre Bolusgabe von Narkosegemisch

eingeleitet. Die Darstellung der verabreichten Medikamente erfolgt in Tabellen nach Teresa Trenkwalder.

#### **Narkosekombination**

Azaperon (Stresnil)	10 mg/kg KG	Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland
Ketamin	20 mg/kg KG	Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland
Atropin	0.02 mg/kg KG	Atropinsulfat-Lösung 0.5 mg/ml, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

Im Anschluss daran wurde ein Zugang über die Ohrvene etabliert und die Narkose vertieft.

#### **Narkosevertiefung**

Midazolam	0.5 mg/kg KG	Midazolam ratiopharm 5 mg/3ml, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Fentanyl	0.05 mg/kg KG	Fentanyl-Janssen 0.5 mg, Janssen-Cilag, Neuss Deutschland

Nach endotrachealer Intubation (Hi-Lo Oral/Nasal Tracheal Tube, Mallinckrodt, Covidien, Dublin, Irland) wurde das Versuchstier mit Raumluft und Sauerstoff beatmet (Servo Ventilator 900C, Siemens-Elma, Schweden), wobei die Sauerstoffsättigung im Blut per Pulsoxymeter (Ohmeda Biox 3700e Puls-Oximeter, Chalfont St Giles, Großbritannien) überwacht wurde. Die Narkose wurde mit 10 mg/kgKG/h Propofol (Recofol 20 mg/ml, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufrechterhalten. Das EKG (Sirecust 304 D, Siemens, München, Deutschland) wurde nach Einthoven über 3 Klebeelektroden abgeleitet.

Sodann erfolgte die Präparation der Versuchstiere, welche mit der Kanülierung der

rechtsseitigen Arteria carotis und Vena jugularis externa begann. An Versuchstag 1 (day 0) wurde die Vene mit einer 11F Katheterschleuse, die Arterie hingegen mit einer langen 10F Katheterschleuse kanüliert (beide Radiofocus Introducer II, Terumo, Tokyo, Japan). Über den großen arteriellen Zugang erfolgte in der unten geschilderten Weise die Implantation des Reduktionsstents.

Vor der Platzierung der Katheterschleusen in die Gefäße erfolgte die Gabe eines Heparin-Bolus (Heparin-Natrium 25000 I.E./5 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) von 20.000 IE intravenös zur Antikoagulation.

Die Schleuse des arteriellen Zugangs wurde in der unter 2.1.3. geschilderten Weise mit dem Druckabnehmer konnektiert um den Aortendruck zu messen.

Anschließend wurde die linksventrikuläre Druckkurve mithilfe eines Messkatheters (7.0 F VSL Pigtail-No Lumen, Transsonic Scisense Inc., Ontario, Canada) aufgezeichnet, an Versuchstag 1 (day 0) vor und direkt nach Implantation des Reduktionsstents, sowie jeweils einmal an Versuchstag 28 (day 28) und 56 (day 56). Nach der ersten Druckmessung im linken Ventrikel erfolgte die Implantation des Reduktionsstents (Stent Aortico SA-R D, PFM, La Paz, Bolivien) über eine 10F Schleuse in die Aorta descendens, wodurch eine Verringerung der Aortenfläche um 60 % induziert wurde. Durch diese, von uns hervorgerufene, Nachlasterhöhung stieg der Aortendruck vor der Stenose deutlich an (vgl. 3.1.1.1.). Nach Durchführung der hämodynamischen Analysen wurde den Tieren der Interventionsgruppe jeweils an Versuchstag 1 (day 0) und 28 (day 28) ein miRNA-Inhibitor (je 15 mg LNA-132 in 15 ml NaCl) appliziert. Zwei Drittel der Dosis wurden in die LAD injiziert, ein Drittel in den RCX. Die Tiere der entsprechenden Vergleichsgruppe erhielten jeweils die gleiche Dosis *scrambled* LNA (LNAscr). Am Ende der Intervention an Versuchstag 1 (day 0) und 28 (day 28) erhielten die Tiere jeweils 250 mg Cefuroxim (Cefuroxim Hikma, Hikma Farmaceutica, Terrugem, Portugal) zur Infektionsprophylaxe intravenös, anschließend wurden die Katheterschleusen gezogen und eine subkutane, sowie kutane Naht (Supolene 3.5/0, Resorba, Nürnberg, Deutschland) zum Wundverschluss durchgeführt. Im Anschluss an die Narkoseausleitung wurden die Tiere wieder in die Ställe zurück gebracht.

An Versuchstag 56 wurde nach der Messung der hämodynamischen Parameter das Herz durch eine intrakardiale Injektion von 20 ml KCl (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) zum Stillstand gebracht. Daraufhin wurde es entnommen und senkrecht zur langen Herzachse in etwa 1 cm dicke Scheiben geschnitten.

Aus diesen wurden wiederum nach einem standardisiertem Protokoll (vgl. Abb. 10) 36 Gewebeproben aus dem linken Ventrikel zur weiteren histologischen und



molekularbiologischen Untersuchung genommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80° C aufbewahrt.

### **2.1.3. Messung hämodynamischer Parameter**

Die Messung der hämodynamischen Parameter fand an allen drei Versuchstagen statt. Am Versuchstag 1, als Baseline-Messung einmal vor und einmal nach Stentimplantation, sowie nach 28 beziehungsweise 56 Tagen, jeweils nach Präparation der Versuchstiere wie oben beschrieben.

Zunächst erfolgte die Messung der Aortendruckkurve über die arterielle Schleuse, welche direkt im Anschluss an die Kanülierung der A. carotis distal über einen Dreiwegehahn mit einem auf Herzhöhe des Tieres angebrachten Druckabnehmer verbunden wurde (CardioSOFT 3.1.5, SonoMetrics, Ontario, Kanada). Das System wurde mit NaCl 0,9 % (B. Braun, Melsungen, Deutschland) gespült, luftleer gehalten und anschließend mit dem umgebenden Luftdruck als Referenz auf 0 mmHg geeicht.

Anschließend wurde der Druck im linken Ventrikel über einen Messkatheter (7.0 F VSL Pigtail, Transsonic Scisense Inc., Ontario, Kanada) gemessen, welcher über die arterielle Schleuse in den linken Ventrikel eingebracht wurde und distal direkt mit dem Messrechner (ADV500 PV System, Transsonic Scisense Inc., Ontario, Kanada) verbunden war. Die korrekte Lage der Katheterspitze im Ventrikel wurde unter Durchleuchtung via C-Bogen (Exposcop 8000, Instrumentarium Imaging Ziehm GmbH, Nürnberg, Deutschland) und anhand der aufgezeichneten Druckkurve (ADV500 PV System, Transsonic Scisense Inc., Ontario, Kanada) überprüft.

Die Analyse des linksventrikulären enddiastolischen Drucks und der linksventrikulären Kontraktilität dienen der Beurteilung der globalen Myokardfunktion. Um ersteren zu erfassen, wurde der LVP nach der Zeit abgeleitet und somit der  $dLVP/dt$  berechnet [122] (7.0F VSL Straight, Transsonic Scisense Inc., Ontario, Kanada).

Der LVEDP wurde anhand des aufgezeichneten Kurvenverlaufs des  $dLVP/dt$  orientierend nach den Ergebnissen von Heimisch *et al.* ausgewertet, hierbei gilt der maximale Anstieg der Kurve als Korrelat des LVEDP, die erhaltenen Werte wurden anhand des ebenfalls korrelierenden EKGs (R-Zacke) überprüft. Der  $dLVP/dt$  (kurz  $dP/dt$ ) gibt wiederum Aufschluss über die maximale Druckanstiegs- beziehungsweise Druckabfallsgeschwindigkeit, welche jeweils mit der Kontraktilitäts- beziehungsweise Relaxationsfähigkeit des Myokards in der linken Kammer korreliert.

Darüber hinaus wurde die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels analysiert. Sie gibt vor allem Hinweise über die systolische Funktion des Herzens. Sie wird errechnet aus der Differenz der planimetrisch ermittelten endsystolischen und enddiastolischen Flächen mithilfe der durchgeführten Laevokardiographien. Diese wurden via Pigtail-Katheter (7.0 F VSL Pigtail, Transsonic Scisense Inc., Ontario, Kanada) im linken Ventrikel dokumentiert, die Angiographie erfolgte wiederum wie oben genannt mittels C-Bogen (Exposcop 8000, Instrumentarium Imaging Ziehm GmbH, Nürnberg, Deutschland). Die Planimetrie wurde mittels der Software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) durchgeführt.

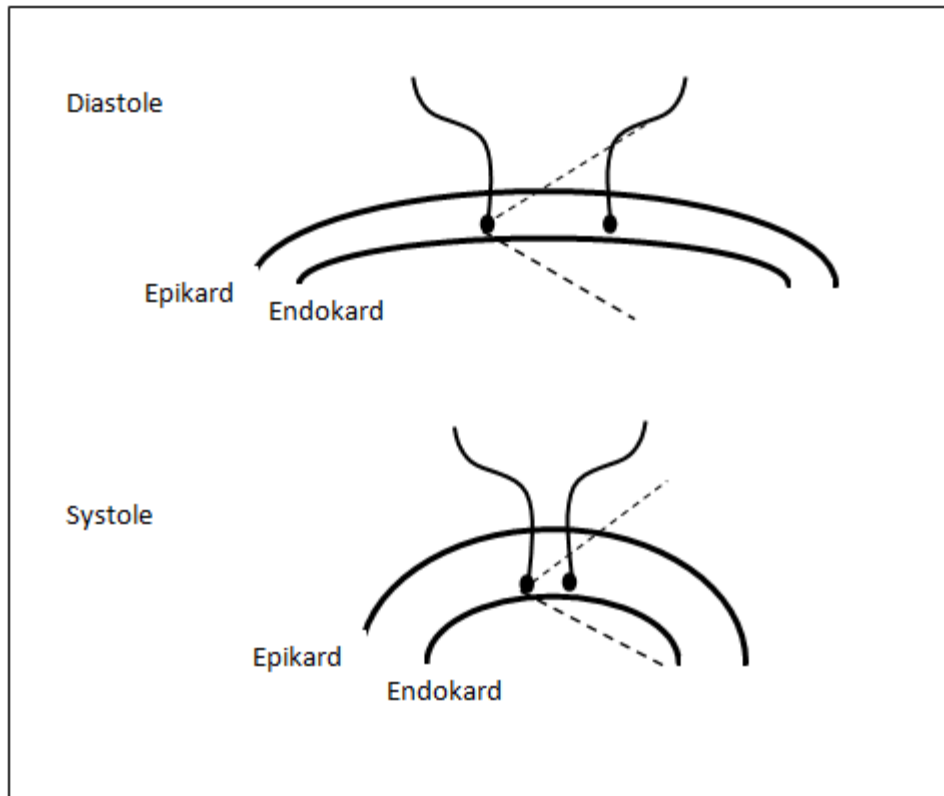
Die Beurteilung der regionalen Myokardfunktion erfolgte mittels Sonomikrometrie nach Hagl *et al.* [123] (SonoMetrics, Ontario, Kanada) an Tag 56. Nachdem die Tiere in tiefer Narkose mit Pancuronium (Pancuronium Inresa 4 mg/2 ml, Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland) relaxiert wurden, erfolgte zunächst die Sternotomie zur Eröffnung des Thorax und anschließend die Inzision und Aufspannung des Perikards. Daraufhin wurden die piezoelektrischen Kristalle (2mm Round Crystals For Large Animals, SonoMetrics, Ontario, Kanada) via Stichinzision (Disposable Scalpel No. 11, Feather Safety Razor Co., Japan) jeweils in das Gebiet der LAD, beziehungsweise des RCX eingebracht. Die Messung der Segmentverkürzung des Herzmuskels erfolgte zuerst in Ruhe, als Baseline der regionalen Myokardfunktion und im Anschluss daran unter rechtsatrialer Schrittmacherstimulation von 120 und 150 Schlägen pro Minute.

Zuvor wurde die korrekte Lage der Schrittmacherelektroden unter Durchleuchtung (Exposcop 8000, Instrumentarium Imaging Ziehm GmbH, Nürnberg, Deutschland) und anhand des abgeleiteten EKGs überprüft.

Je nach Ausmaß der lokalen Myokardschädigung ist die Segmentverkürzung mehr oder weniger stark eingeschränkt, sie wird ausgedrückt als prozentuale Veränderung der Segmentlänge (% SS) der Kardiomyozyten. Die enddiastolische und endsystolische Segmentlänge ergeben, zueinander ins Verhältnis gesetzt, folgende Formel zur Berechnung der Segmentverkürzung:  $\% \text{ SS} = (\text{EDL} - \text{ESL}) / \text{EDL} \times 100$ .

Durch die subendokardiale Einbringung zweier piezoelektrischer Kristalle wird die Veränderung der Ultraschalllaufzeit zwischen den Kristallen als Korrelat der Segmentverkürzung während der Herzaktion ermittelt. Sie werden in einem Abstand von etwa 1,5 cm zueinander positioniert und fungieren als Transceiver (abwechselnd Sender und Empfänger). Die Ultraschalllaufzeit wird bei bekannter Laufzeit des Schalls in biologischen

Matrices (1540 m/s) in die zurückgelegte Distanz umgerechnet. Die Kontraktion des Myokards bedingt eine diskrete Messverzögerung bei der Ansteuerung der Kristalle, woraus eine vernachlässigbar kleine örtliche Unschärfe bei der Messung der Segmentverkürzung entsteht. Durch die Messung der Ultraschalllaufzeit alle 15 ns kann eine Auflösung der Sonomikrometrie von 24  $\mu\text{m}$  erreicht werden.



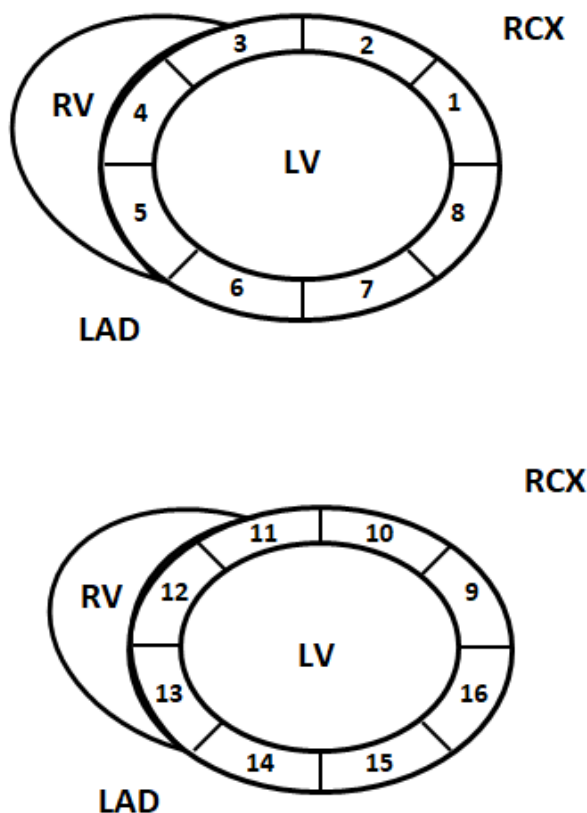
**Abbildung 9: Schematische Darstellung der piezoelektrischen Kristalle im Myokard zur Durchführung der Sonomikrometrie. (modifiziert nach Robert Vachenaer)**

Die oben genannten Parameter Aortendruck, LVP und Segmentverkürzung wurden zeitlich korrelierend mit dem EKG aufgezeichnet. Alle einzelnen Parameter wurden jeweils über eine Minute im Verlauf aufgezeichnet und im Anschluss daran, gemittelt über fünf repräsentative Herzschläge, ausgewertet.

## 2.2. Histologie und Molekularbiologie

Für alle Färbungen wurden 5 µm dicke Kryoschnitte (Kryotom, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) nach folgendem Schema angefertigt: Quer zur apikalen Längsrichtung wurde das Herz in fünf horizontale Schnittebenen geschnitten. Danach wurde der linke Ventrikel beginnend am Apex, standardisiert in 36 Proben im Uhrzeigersinn aufgeteilt. Für die Färbungen wurden jeweils 2 repräsentative Proben (Nr. 9 und 13, vgl. exemplarisches Schema von 2 Schnittebenen) aus dem LAD- beziehungsweise RCX-Areal gewählt. Pro Objektträger (Thermo Scientific Superfrost® Plus Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland) wurden davon jeweils drei Schnitte aufgezogen und diese wurden dann bei - 80° C zwischengelagert. Je nach Färbung wurden Fluoreszenz- oder Durchlichtfotografien angefertigt und ausgewertet. Die Darstellung der verwendeten Materialien erfolgt in Tabellen nach Teresa Trenkwalder.

### Basis



### Apex

Abbildung 10: Exemplarische Ansicht von 2 Schnittebenen des standardisierten Protokolls zur Gewebeentnahme am Herz (dargestellt nach Rabea Hinkel).

### 2.2.1. Kardiomyozytengröße

Nachdem bereits im Mausmodell eine Zunahme des kardiomyozytären Durchmessers nach TAC gezeigt wurde [65], untersuchten wir auch in dieser Arbeit die Auswirkungen von Pressure-Overload auf die Größe der Herzmuskelzellen als Korrelat der Hypertrophie. Hierfür benutzten wir die Wheat Germ Agglutinin (WGA) Färbung nach folgendem Protokoll (modifiziert nach Andrea Marion, University of Illinois - Chicago):

#### **Materialien:**

##### **Chemikalien**

Aceton	4° C	Merck, Whitehouse Station, USA
Wheat Germ Agglutinin Alexa Fluor ® 488 Conjugate	100 µg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Vectashield Mounting Medium with DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)		Vector Laboratories, Burlingame, USA
PBS		siehe Pecam-Färbung

#### **Methode:**

- Kryoschnitte auftauen lassen
- 10 min in Aceton fixieren
- 3 x 10 min in PBS waschen
- 60 min mit WGA - Antikörper und CaCl<sub>2</sub> in PBS inkubieren
- 3 x 10 min in PBS waschen
- Mit DAPI einbetten

Direkt im Anschluss wurden die Bilder unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (AxioVision, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und fotografiert (AxioVision Rel.4.8., Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Ausgewertet wurden die Bilder ebenfalls mit der AxioVision Rel.4.8. Software, hierfür wurde standardisiert die Fläche aller Zellen pro definiertem 5 x 5 µm-Rahmen vermessen. Wie oben beschrieben, wurden jeweils 2 Proben à 3 Objektträger mit

je 3 Schnitten mit jeweils 3-5 Mikroskopbildern untersucht, dies entspricht für die WGA-Färbung mehr als 1000 analysierten Zellen.

### 2.2.2. Mikrozirkulation

Die Analyse der Kapillarisierung des linken Ventrikels erfolgte anhand der Pecam-1-Färbung für CD31, welche Kapillaren fluoreszenzmikroskopisch rot darstellt. Die Fluoreszenz entsteht durch entsprechend markierte Antikörper, welche an die Antigene auf den Kapillaren binden. Korrelierend erfolgte die Analyse der Gefäßreife durch die Darstellung der Perizyten in der NG2-Färbung. Das verwendete Protokoll wurde speziell für Kryoschnitte von Schweineproben nach Teresa Trenkwalder modifiziert.

#### **Materialien:**

##### **PBS**

NaCl	8 g	B. Braun Melsungen AG, Melsungen Deutschland
KCl	0.2 g	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.	1000 ml	

##### **Blocking Solution**

Bovine Serum Albumine (BSA)	2 %	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Triton-x-100	0.2 %	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Gelöst in PBS		

### **Antikörper**

---

CD31/Pecam-1/Rabbit IgG in Blocking Solution [Primary Antibody]	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-Goat IgG-R (Donkey) in Antibody Diluent [Secondary Antibody]	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

---

### **Chemikalien und Zubehör**

---

Aceton	4° C	Merck, Whitehouse Station, USA
Hydrophober Stift (Dako Pen)		Dako, Hamburg, Deutschland
Vectashield Mounting Medium with DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)		Vector Laboratories, Burlingame, USA

---

### **Methode:**

1. Objektträger mit Gewebeproben für 15 min in Aceton 4° C fixieren
2. Objektträger trocken tupfen
3. Gewebe mit Dako Pen einkreisen
4. 30 min in der Blocking Solution inkubieren
5. Primary Antibody in Blocking Solution auf die Objektträger pipettieren, bei 4° C über Nacht einwirken lassen
6. 3 mal 10 min in PBS waschen
7. Secondary Antibody in Antibody Diluent aufpipettieren, für 2 h bei Raumtemperatur stehen lassen
8. 3 mal 10 min in PBS waschen
9. Mit DAPI einbetten

Um einen Rückgang der Fluoreszenz zu vermeiden, wurden die Gewebeproben direkt im Anschluss unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (AxioVision, Zeiss, Oberkochen,

Deutschland) und fotografiert (AxioVision Rel.4.8., Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Daraufhin wurden die Kapillaren standardisiert am Computer ausgezählt.

### 2.2.3. Quantifizierung der Fibrose

Um die makroskopisch sichtbare Fibrose der gewonnenen Gewebeproben quantifizieren zu können, wurde bei standardisiert ausgewählten Proben, welche jeweils den linken Ventrikel im LAD- beziehungsweise RCX-Areal repräsentieren, die Sirius Red Färbung durchgeführt. Diese stellt kollagenöse Strukturen rot dar, Zellstroma ist gelb gefärbt und Zellkerne werden mithilfe der Hämalaun-Gegenfärbung blau präsentiert. Auf diese Art und Weise erhält man nicht nur Aufschluss über die Lokalisation der fibrotischen Areale im linken Ventrikel, sondern auch über dessen Fibrosegehalt. Das verwendete Protokoll wurde speziell für Kryoschnitte nach Hanke Mollnau modifiziert.

#### **Materialien:**

##### **Bouin-Lösung**

Gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung	15 ml	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Eisessig	1 ml	Merck, Whitehouse Station, USA
Formol	5 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland

##### **Chemikalien**

Sirius Red	Polysciences Inc., Warrington, USA
HCl	Merck, KGaA Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Roth, Karlsruhe, Deutschland



Xylol

Merck, KGaA  
Darmstadt, Deutschland

Entellan

Euromex, Bratislava,  
Slowakei

---

### **Methode:**

1. Die Gewebeproben werden für eine Stunde in Bouin-Lösung in den Inkubator (37° C) verbracht.
2. Anschließend für eine Stunde in 0.1% Sirius Red/ Pikrinsäure-Lösung belassen.
3. Kurze Überführung in 0.01 N HCl um Überfärbungen zu vermeiden.
4. Kurz in Aqua dest. reinigen
5. Kernfärbung in Hämalaun für 5 Minuten
6. 5 Minuten fließend wässern
7. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe:
  - EtOH 70%                      kurz eintauchen
  - EtOH 96%                      3 Minuten
  - EtOH 100%                    3 Minuten
  - EtOH 100%                    3 Minuten
  - EtOH 100%                    2 Minuten
  - Xylol                              10 Minuten
8. Einbettung in Entellan

Anschließend wurden die Gewebeproben unter dem Lichtmikroskop (AxioVert 100, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in 2-facher Vergrößerung betrachtet und fotografiert (AxioVision Rel.4.8, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Daraufhin wurde die Fibrosequantifizierung nach einem standardisierten Protokoll mit den Bildbearbeitungsprogrammen Image J und Gimp (GIMP Development Team) durchgeführt.

### **2.3. Statistik**

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (standard error of the mean, SEM). Signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaarter t-Tests, ANOVA-Analysen, Bonferroni-Tests und Multivariatanalysen berechnet. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert  $< 0.05$  festgelegt und entsprechende Ergebnisse in den Abbildungen mit einem (\*) markiert. Hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0.01$ ) wurden mit (\*\*) versehen.

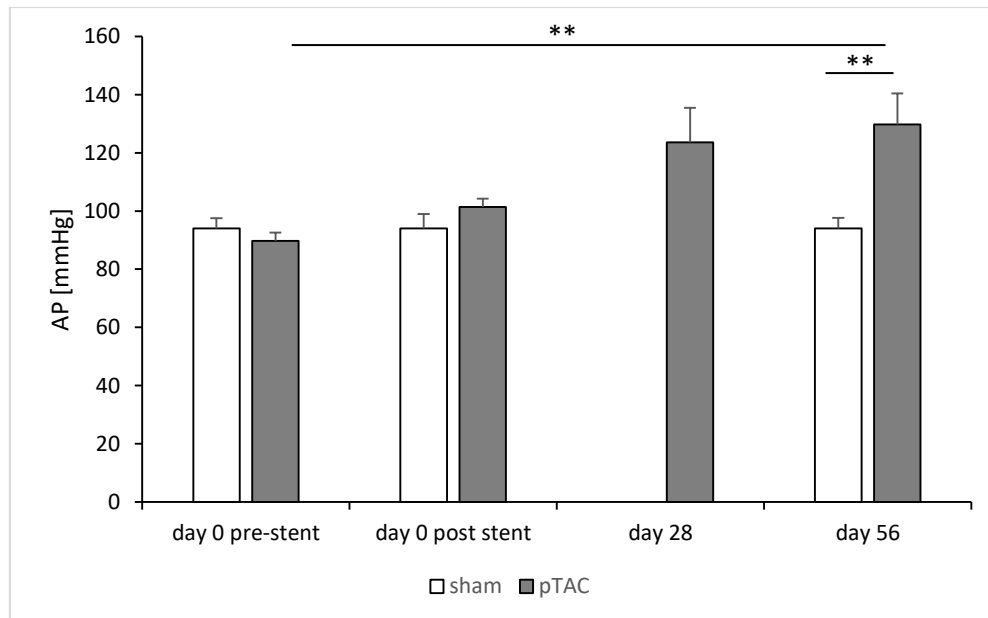
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Etablierung eines neuen perkutanen Modells der Herzinsuffizienz durch Pressure Overload

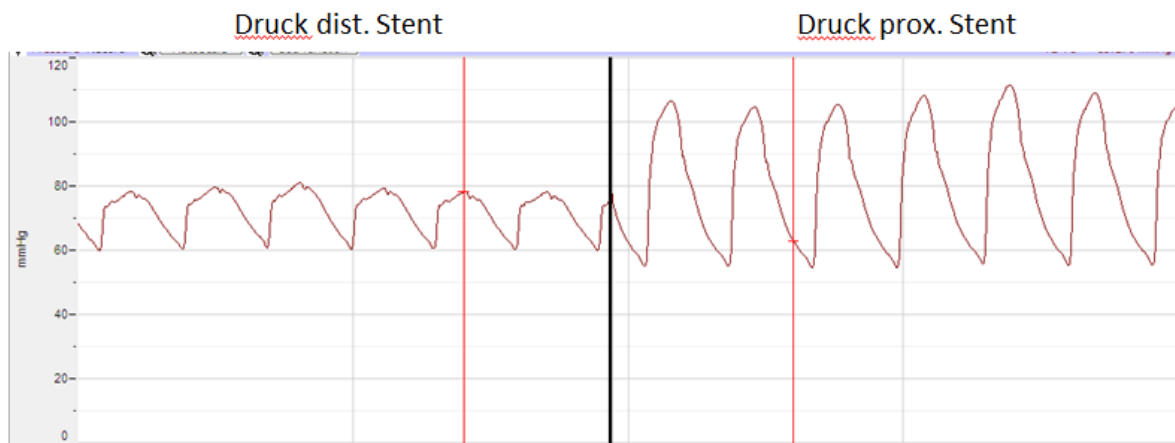
##### 3.1.1. Hämodynamik

##### 3.1.1.1. Aortaler Druck (AP)

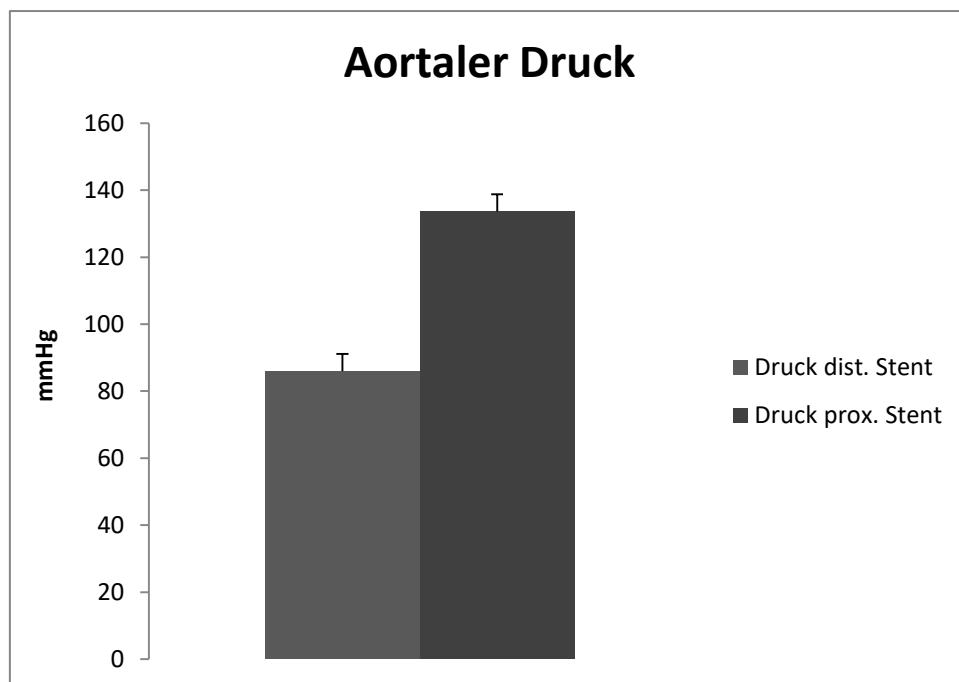
Die Erfassung des Druckes in der Aorta erfolgte zur Überprüfung des Modells und der induzierten Stenose. Um die durch den Reduktionsstent induzierte Verringerung der Aortenfläche um 60 % zu analysieren, wurde am Versuchstag 1 (day 0) der aortale Druck direkt vor und nach der Stentimplantation, sowie jeweils einmal an Versuchstag 28 (day 28) und 56 (day 56) bestimmt. Die Gruppengröße beträgt, wie für alle weiteren analysierten Parameter,  $n = 6$ . Direkt nach der Stentimplantation kommt es zu einem Druckanstieg von etwa 10 mmHg in der Aorta, genauer von  $89.7 \pm 2.5$  mmHg auf  $101.4 \pm 2.3$  mmHg. Im weiteren Versuchsverlauf steigt der Aortendruck auf  $123.5 \pm 4.2$  mmHg an Versuchstag 28. An Versuchstag 56 kann eine hoch signifikante ( $p < 0.01$ ) Erhöhung des aortalen Drucks auf  $129.7 \pm 2.1$  mmHg im Vergleich zur sham-Gruppe beobachtet werden.



**Abbildung 11: Zunahme des AP von 89.7 mmHg vor (day 0 pre-stent) Stentimplantation auf 101.4 mmHg nach (day 0 post stent) Implantation des Reduktionsstents, sowie auf 123.5 mmHg an Versuchstag 28 (day 28), beziehungsweise 129.7 mmHg an Tag 56 (day 56). ( $n=6$ , Mean  $\pm$  SEM \*\*  $p < 0.01$  sham vs. pTAC day 56, pTAC day 0 post Stent vs. day 56)**



**Abbildung 12: Druckabfall in der distalen Aorta (dist. Stent) versus erhöhtem Druck in der proximalen Aorta (prox. Stent).**



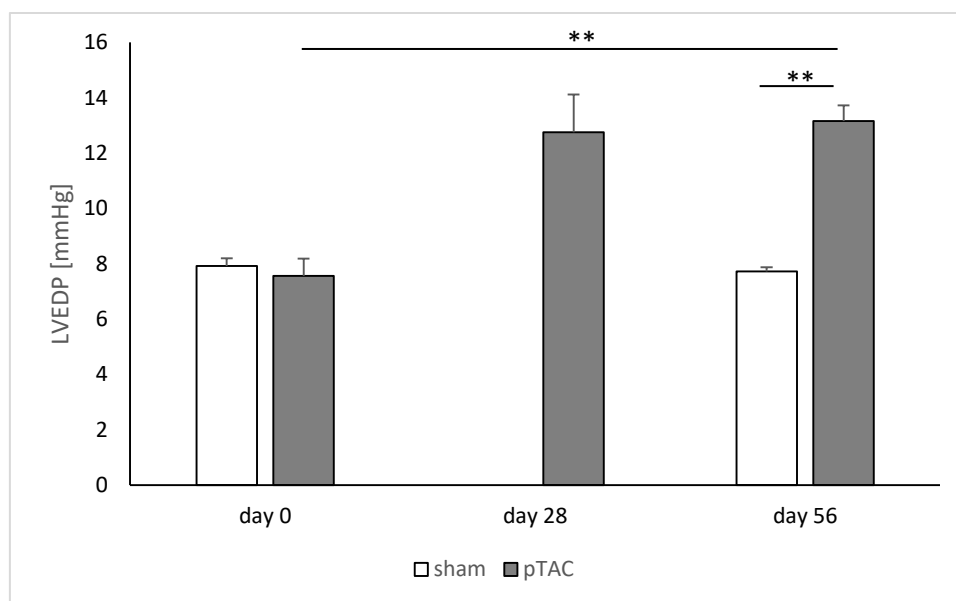
**Abbildung 13: Druckgradient in der Aorta distal und proximal des Reduktionsstents.**

### 3.1.1.2. Globale Myokardfunktion

Im Rahmen der hämodynamischen Analyse zur Funktionalität des porcinen Modells der Drucküberlastung am Herzen werden zur Beurteilung der globalen Myokardfunktion mehrere Parameter erfasst. Dazu zählen unter anderem der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) und die Ejektionsfraktion (EF).

#### 3.1.1.2.1. Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)

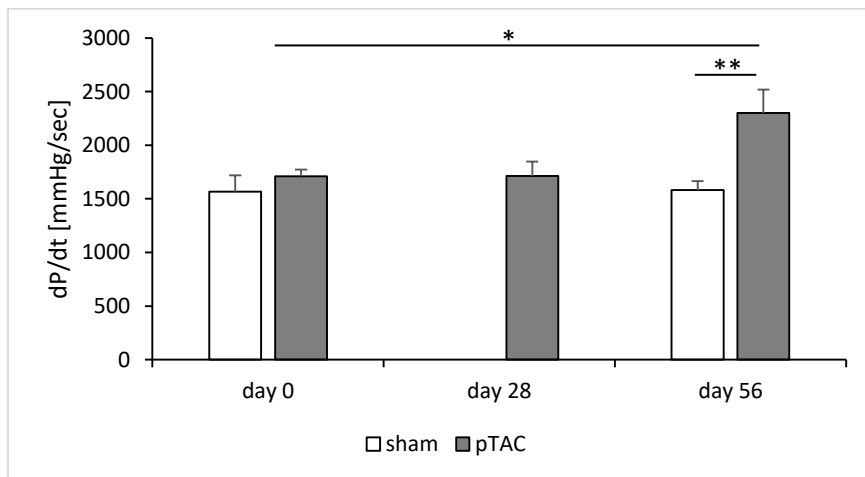
Der linksventrikuläre enddiastolische Druck ist ein anerkannter Prädiktor für eine sich entwickelnde Herzinsuffizienz. Die Versuchstiere zeigen einen Anstieg des LVEDP über den Versuchszeitraum von  $7.5 \pm 0.5$  mmHg an Versuchstag 1 (day 0) über  $12.7 \pm 0.9$  mmHg auf  $13.1 \pm 0.8$  mmHg am letzten Versuchstag. Ein hoch signifikanter höherer LVEDP in der pTAC-Gruppe ergibt sich im Vergleich von Versuchstag 56 mit Versuchstag 1 (day 56 vs. day 0), sowie zwischen der pTAC- und der sham-Gruppe an Versuchstag 56 (sham vs. pTAC, day 56).



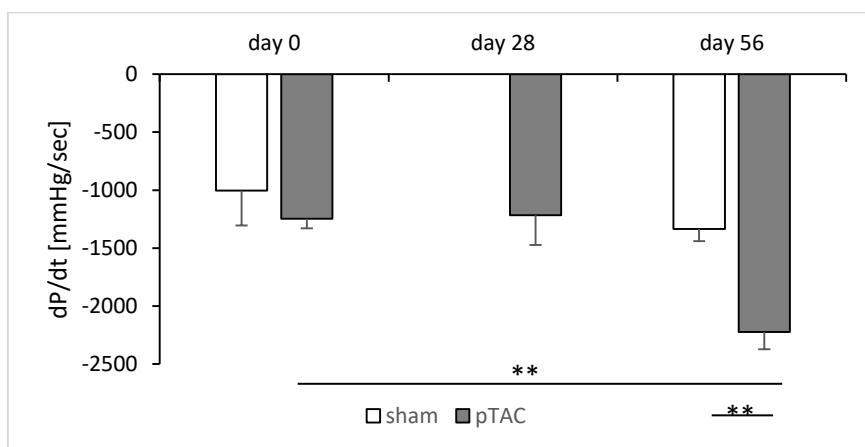
**Abbildung 14:** Zunahme des LVEDP im Versuchsverlauf von 7.5 mmHg an Versuchstag 1 (day 0) über 12.7 mmHg an Versuchstag 28 (day 28) auf 13.1 mmHg an Versuchstag 56 (day 56). Signifikant höherer LVEDP in der pTAC-Gruppe (day 56 vs. day 0) und im Vergleich sham vs. pTAC (day 56). (n=6, Mean  $\pm$  SEM \*\* p < 0.01)

### 3.1.1.2.2. Kontraktion und Relaxation

Als Korrelat der Kontraktions- beziehungsweise Relaxationsgeschwindigkeit des Myokards ist der linksventrikuläre Druck, abgeleitet nach der Zeit, ein wichtiger Bestandteil der Analyse der globalen myokardialen Funktion. Insbesondere von Interesse ist die diastolische Relaxationsfähigkeit. Im Versuchsverlauf zeigt sich eine Zunahme des  $dP/dt_{\max}$  von  $1710 \pm 149$  mmHg/s über  $1713 \pm 130$  mmHg/s auf  $2299 \pm 140$  mmHg/s. Am letzten Versuchstag ergibt sich ein hoch signifikant größerer  $dP/dt_{\max}$  in der pTAC-Gruppe vs. sham. Auch verglichen mit dem Ausgangswert an Versuchstag 1 (day 0) ergibt sich ein signifikant höherer  $dP/dt_{\max}$  innerhalb der pTAC-Gruppe. Der  $dP/dt_{\min}$  wird im Versuchsverlauf hoch signifikant negativer: von  $-1247 \pm 50$  mmHg/s an Versuchstag 1 (day 0), über  $-1217 \pm 166$  mmHg/s, auf  $-2223 \pm 112$  mmHg/s am letzten Versuchstag (day 56).



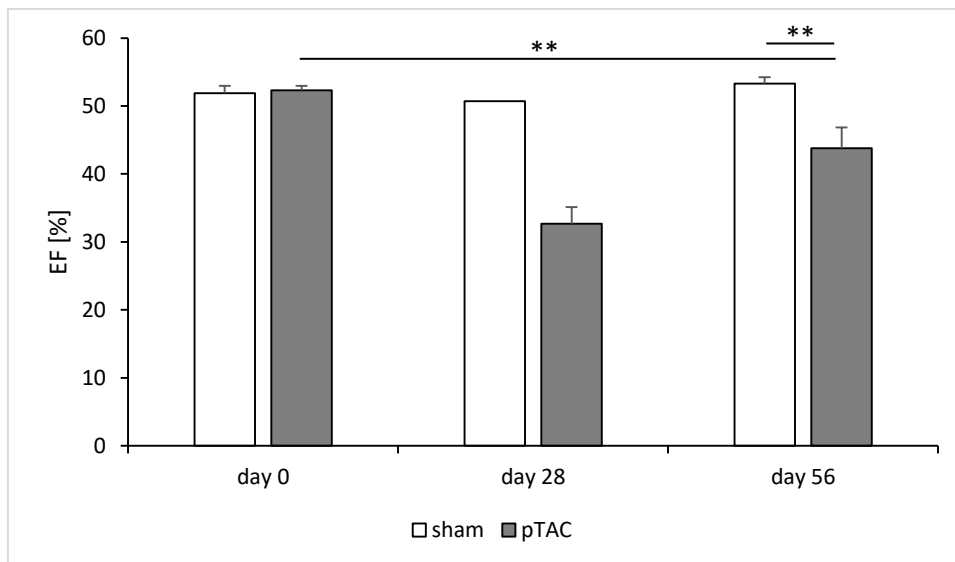
**Abbildung 15:** Steigender  $dP/dt_{\max}$  von Versuchstag 1 (day 0) bis Versuchstag 56 (day 56) in der pTAC-Gruppe, mit hoch signifikant größerem  $dP/dt_{\max}$  an Versuchstag 56 (day 56). (n=6, Mean  $\pm$  SEM \*\* p < 0.01 pTAC vs. sham, \* p < 0.05 pTAC day 0 vs. day 56)



**Abbildung 16:** Steigender  $dP/dt_{\min}$  von Versuchstag 1 (day 0) bis Versuchstag 56 (day 56) in der pTAC-Gruppe, mit ebenfalls signifikant höherem  $dP/dt_{\min}$  an Versuchstag 56 (day 56). (n=6, Mean  $\pm$  SEM \*\* p < 0.01 pTAC vs. sham, \*\* p < 0.01 pTAC day 0 vs. day 56)

### 3.1.1.2.3. Ejektionsfraktion (EF)

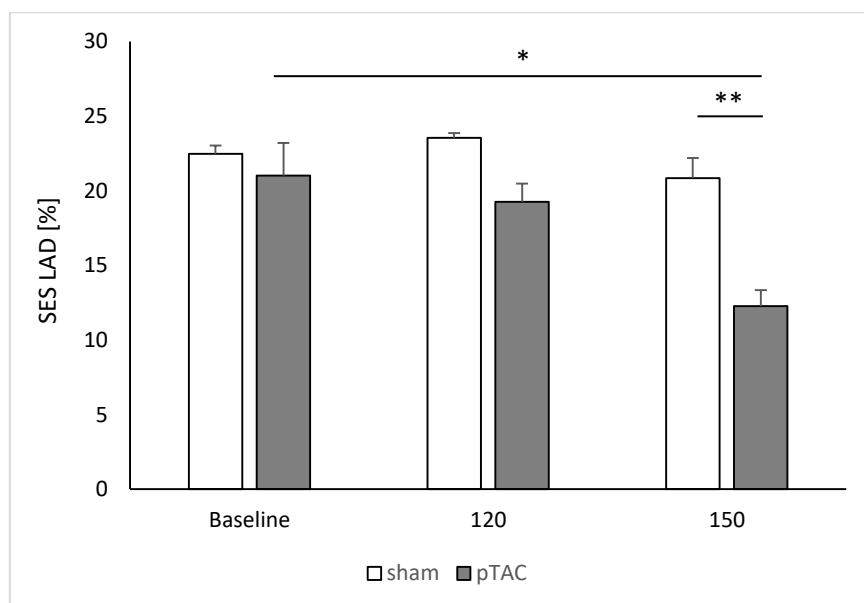
Zuletzt wurde die Auswurfraction als Parameter zur Beurteilung der globalen Myokardfunktion herangezogen. Sie dient vordergründig zur Analyse der systolischen Funktion des linken Ventrikels. Deutlich sichtbar wird hier, dass die EF von einem normalen Ausgangsniveau von  $52.3 \pm 0.5 \%$  über  $32.7 \pm 2.1 \%$  auf  $43.8 \pm 0.2 \%$  im Versuchsverlauf absinkt. So ergibt sich an Versuchstag 56 (day 56) eine hoch signifikant geringere EF in der pTAC- vs. in der sham-Gruppe, vergleicht man die EF in der pTAC-Gruppe zu Beginn des Versuchs (day 0) mit dem letzten Versuchstag (day 56), so zeigt sich auch hier ein hoch signifikanter Unterschied.



**Abbildung 17: Signifikante Abnahme der Ejektionsfraktion von 50.9 % gemessen an Versuchstag 1 (day 0), über 35.5 % auf 34.1 % an letzten Versuchstag (day 56). (n=6, Mean ± SEM \*\* p < 0.01 pTAC vs. sham day 56, \*\* p < 0.01 pTAC day 0 vs. day 56)**

### 3.1.1.3. Lokale Myokardfunktion

Die lokale oder regionale Myokardfunktion wird, wie oben beschrieben, als Verhältnis der endsystolischen zur enddiastolischen Segmentverkürzung des Herzmuskels dargestellt. Sie wurde am Versuchstag 56 in Ruhe als Baseline, sowie unter rechtsatrialer Stimulation bei Werten von 120 und 150 Schlägen pro Minute (bpm) in LAD- sowie in RCX-perfundierten Arealen des linken Ventrikels gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die Tiere einen signifikanten Abfall der Segmentverkürzung (SES) unter Schrittmacherstimulation aufweisen. So verringerte sich die Segmentverkürzung unter Stimulation mit einer Frequenz von 120 auf  $19.2 \pm 1.7$  % im Vergleich zu den  $22.5 \pm 1.2$  % der Baseline. Bei 150 bpm betrug die Segmentverkürzung nur noch  $12.3 \pm 1.4$  %. In der Graphik beigefügt sind jeweils entsprechende Werte von Kontrolltieren (sham).



**Abbildung 18: Lokale Myokardfunktion, gemessen mittels Sonomikrometrie im Versorgungsgebiet der LAD an Versuchstag 56 in Ruhe, sowie unter Schrittmacher-Stimulation mit 120 und 150 bpm. Es zeigt sich eine Abnahme von 22.5 % SES in der Baseline auf 19.2 % bei 120 bpm, beziehungsweise 12.3 % bei 150 bpm, was einen hoch signifikanten Abfall vs. sham bei 150 bpm bedeutet. In der pTAC-Gruppe ergibt sich eine signifikant geringere SES im Vergleich Baseline vs. 150 bpm. (n=6, Mean ± SEM, \*\* p < 0.01 sham vs. pTAC bei 150 bpm, \* p < 0.05 pTAC Baseline vs. 150 bpm)**



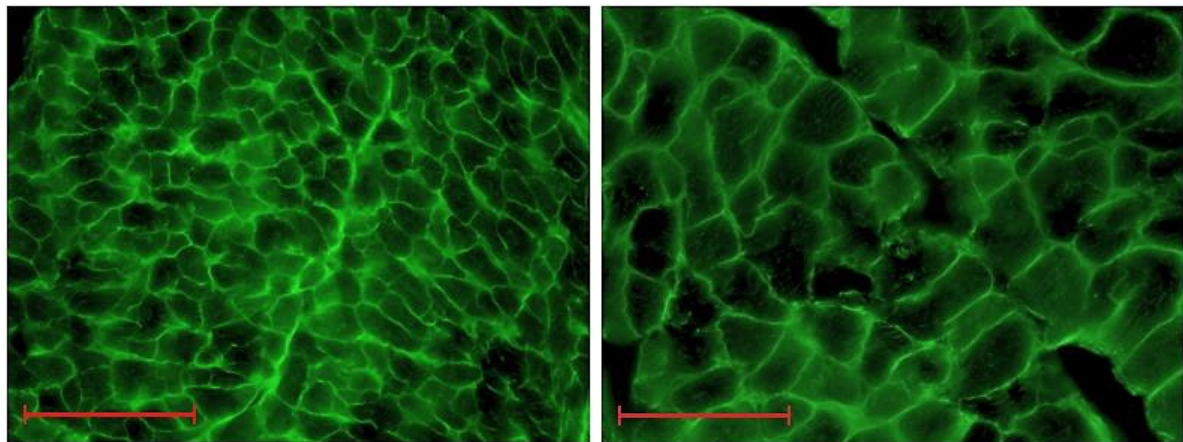
### 3.1.2. Hypertrophie

Zur Analyse der Hypertrophie als eine der zentralen, zu erwartenden Folgen im pTAC-Modell, erfolgte die histologische Analyse mittels WGA-Färbung.

Bereits rein optisch imponiert der deutliche Unterschied sowohl makro- also auch mikroskopisch zwischen den Kontrolltieren und den drucküberlasteten Tieren:

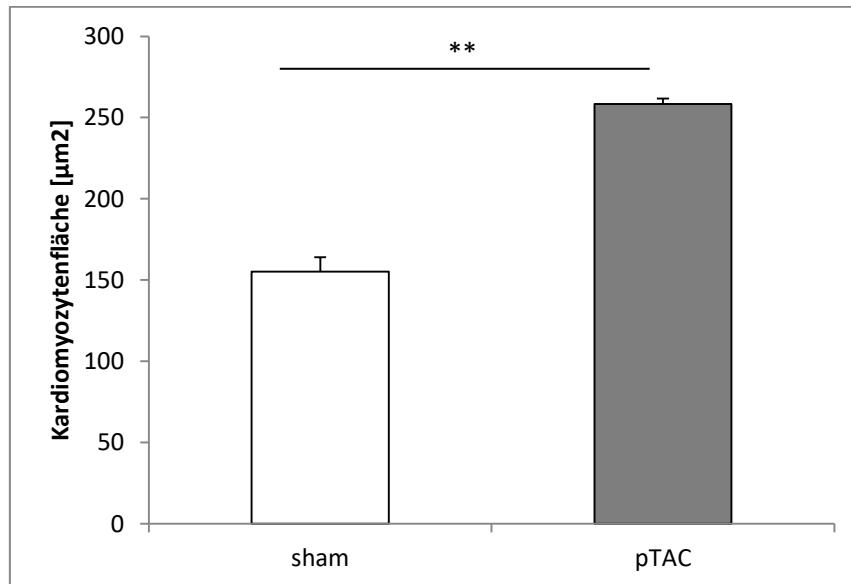


**Abbildung 19:** Axial entnommene Gewebeproben eines Sham Tieres (links) und eines pTAC Tieres (rechts).



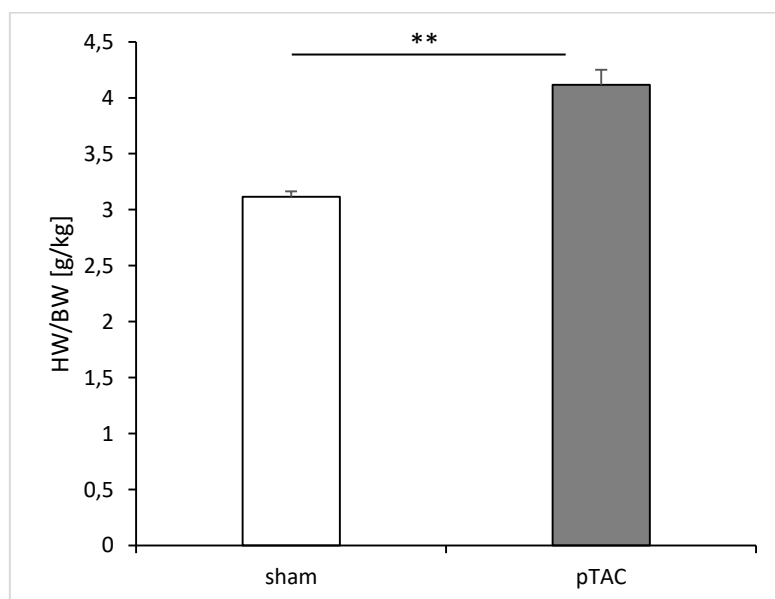
**Abbildung 20:** Kardiomyozyten eines Sham-Tieres (linkes Bild) im direkten optischen Vergleich mit einem pTAC-Tier (rechtes Bild) dargestellt in der WGA-Färbung (Maßstabsskala 100 µm).

In der quantitativen Darstellung weist die sham-Gruppe mit einer mittleren Kardiomyozytenfläche von  $155.16 \pm 4.32 \mu\text{m}^2$  deutlich geringere Werte auf als die pTAC-Tiere, welche bei  $258.39 \pm 8.97 \mu\text{m}^2$  lagen.



**Abbildung 21: Hoch signifikante Flächenzunahme der Kardiomyozyten der pTAC Tiere ( $258.39 \mu\text{m}^2$ ) im Vergleich zu den Sham-Tieren ( $155.16 \mu\text{m}^2$ ), dargestellt in der WGA-Färbung. (n=6, Mean  $\pm$  SEM \*\*  $p < 0.01$  sham vs. pTAC)**

Auch die Analyse des Verhältnisses zwischen Herz- und Körpergewicht zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen der pTAC- und der Sham-Gruppe: Bei den Sham Tieren lag die HW/BW-Ratio bei  $3.11 \pm 0.05$ , während sie bei den pTAC Tieren bei  $4.11 \pm 0.04$  lag.



**Abbildung 22: Hoch signifikant größere HW/BW-Ratio in der pTAC Gruppe (4.11) im Vergleich mit der Sham Gruppe (3.11) (n=6, Mean  $\pm$  SEM \*\*  $p < 0.01$  pTAC vs. sham)**

### 3.1.3. Kapillarisation

Zur Analyse der Kapillardichte und der Anlagerung von Perizyten wurden in oben beschriebener Weise (vgl. 2.2.2.) Doppelimmunofluoreszenzfärbungen angefertigt, wobei Pecam-1 als Marker für Kapillaren und NG2 als Nachweis für Perizyten analysiert wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Tiere der pTAC-Gruppe deutlich weniger Kapillaren ( $494.0 \pm 20.1$ ) als die Sham Tiere ( $946.3 \pm 27.5$ ) aufwiesen.

Auch die Anzahl der Perizyten verhielten sich dementsprechend und war in der Sham Gruppe ( $640.8 \pm 29.4$ ) höher als in der Gruppe der drucküberlasteten Tiere ( $317.1 \pm 10.2$ ).

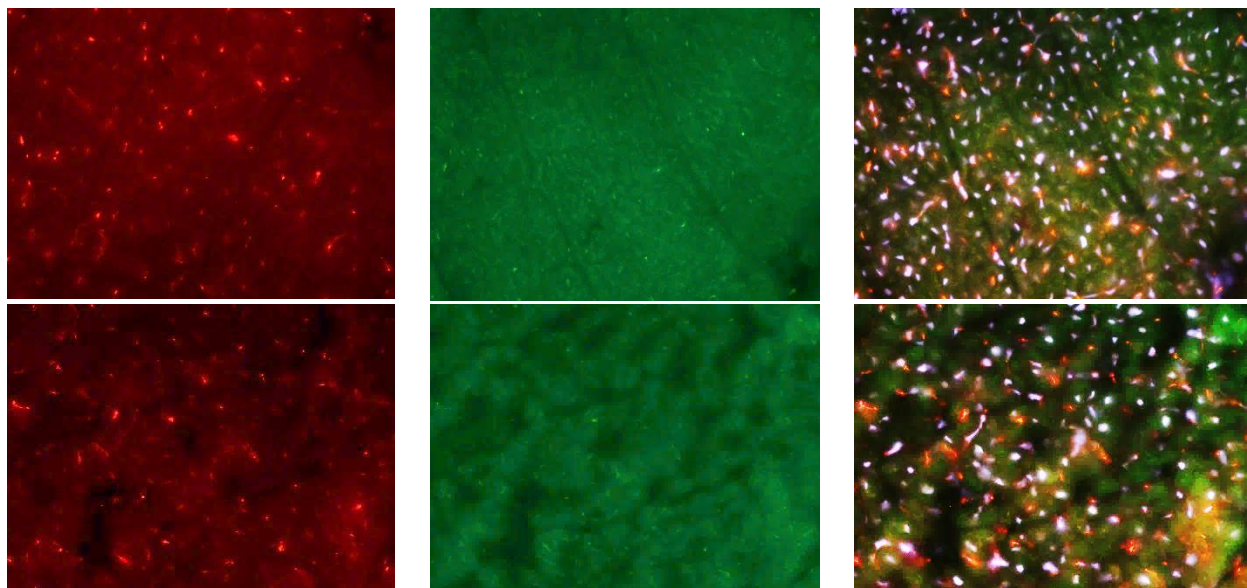


Abbildung 23: Sham in der oberen Zeile vs. pTAC unten. Links die Kapillaren in der Pecam-1-Färbung, in der Mitte die Perizyten in der NG2-Färbung, rechts merged mit DAPI.

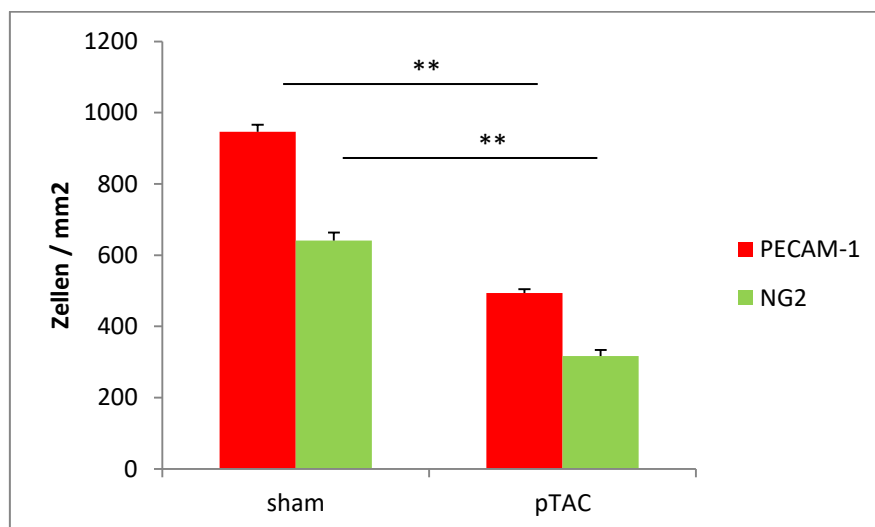
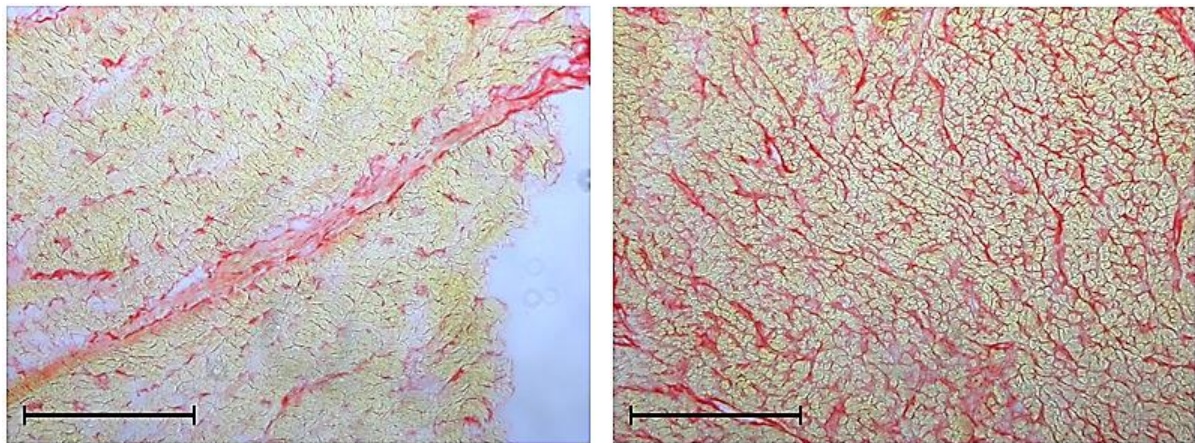


Abbildung 24: Abnahme der Kapillardichte in der pTAC-Gruppe (494.0) im Vergleich zur Sham Gruppe (946.3) dargestellt durch die Pecam-1-Färbung, sowie der Perizyten in der pTAC-Gruppe (317.1) im Vergleich zur Sham Gruppe (640.8) analysiert durch die NG2-Färbung. (n=6, Mean  $\pm$  SEM \*\* p < 0.01 sham vs. pTAC)

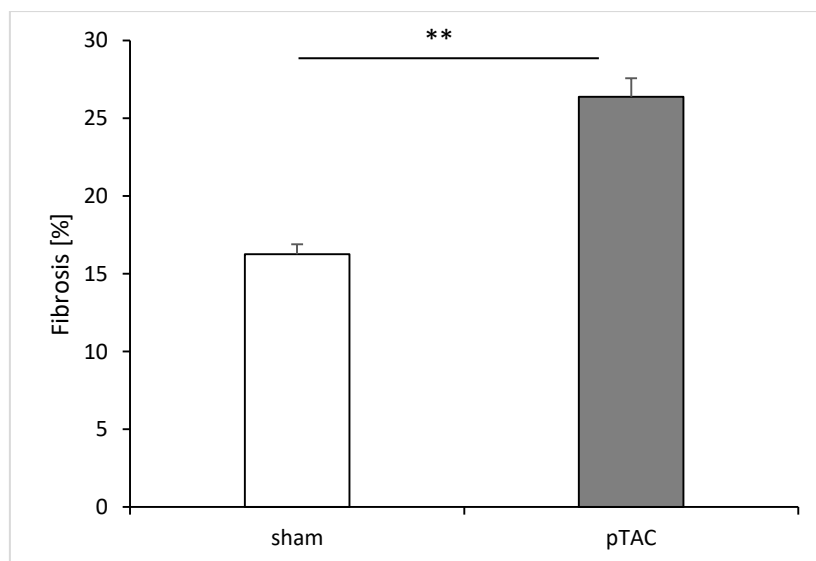
### 3.1.4. Fibrose

Da der Fibrosegehalt des Ventrikels bedeutenden Einfluss auf dessen Elastizität, Kontraktions- und damit Pumpfähigkeit hat, wurde die Sirius Red Färbung in der oben beschriebenen Weise zur Quantifizierung der fibrotischen Anteile des linken Ventrikels durchgeführt. Um Vergleichswerte zu definieren, wurde eine Gruppe gesunder Kontrolltiere der gleichen Färbung und Analyse unterzogen. Dabei zeigte sich, dass im linken Ventrikel ein Grundgehalt an Fibrose (sham) von  $16.3 \pm 0.6 \%$  vorhanden ist. Im Gegensatz dazu wiesen die pTAC-Tiere ein deutlich höheres Fibroseniveau von  $26.4 \pm 0.6 \%$  auf.

Auch hierbei zeigen sich bereits optisch deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen:



**Abbildung 25:** Sirius Red Färbung bei einem sham-Tier (linkes Bild) im optischen Vergleich mit einem pTAC-Tier (rechtes Bild), fibrotische Areale stellen sich rot dar (Maßstabsskala  $100 \mu\text{m}$ ).



**Abbildung 26:** Fibrosegehalt in Prozent Flächenanteil am linken Ventrikel, quantifiziert durch die Sirius Red Färbung. Die pTAC Tiere weisen einen hoch signifikant höheren Fibroseanteil (26.4 %) im Vergleich zu den Sham Tieren (16.3 %) auf. (n=6, Mean  $\pm$  SEM \*\*  $p < 0.01$  sham vs. pTAC)

## 3.2. miRNA-132 Inhibition

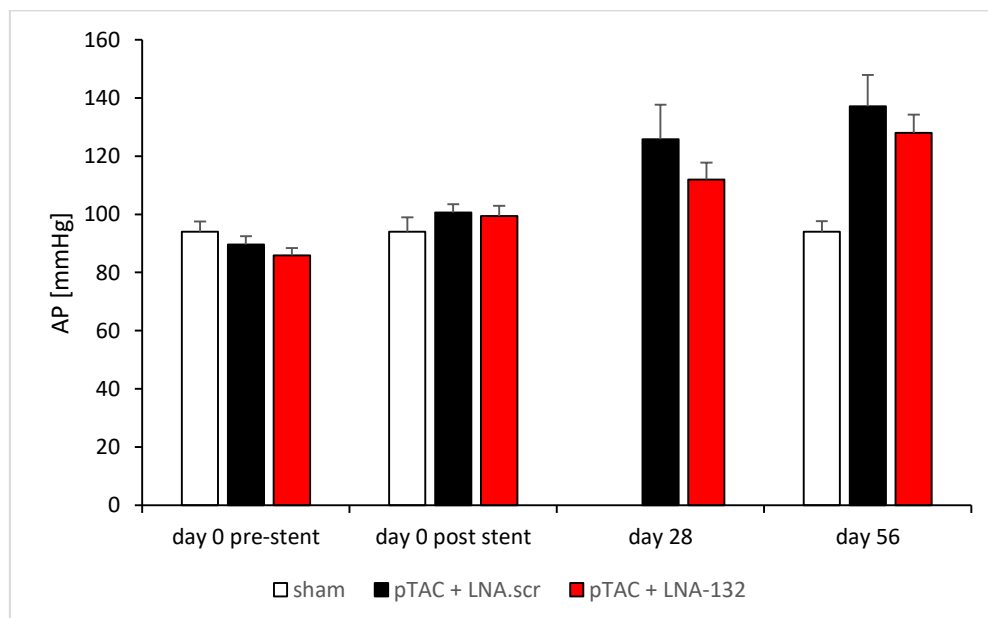
### 3.2.1. Hämodynamik

Das perkutane Modell der Herzinsuffizienz durch Drucküberlastung (pTAC) wurde unter anderem explizit dafür geschaffen, neue Therapieansätze der Hypertrophie-induzierten Herzinsuffizienz in einem klinisch relevanten Ansatz zu erproben. In diesem Rahmen wurde den Tieren der Therapiegruppe, wie oben beschrieben, ein miRNA-Inhibitor (pTAC/LNA-132) verabreicht.

Die Therapiegruppe (pTAC/LNA-132) durchlief die gleichen Funktionsanalysen wie die vorher beschriebenen Gruppen und wird in allen folgenden Abbildungen jeweils mit der pTAC/LNAscr und der sham-Gruppe verglichen.

#### 3.2.1.1. Aortaler Druck (AP)

Die Tiere der pTAC/LNA-132 Gruppe zeigten einen Anstieg des aortalen Druckes (AP) von  $85.9 \pm 2.5$  mmHg prä-Stent (day 0 pre-Stent) auf  $99.4 \pm 3.5$  mmHg post-Stent (day 0 post stent). Der AP stieg im Versuchsverlauf an Versuchstag 28 (day 28) weiterhin auf  $111.9 \pm 5.9$  mmHg, respektive  $127.9 \pm 6.3$  mmHg an Versuchstag 56 (day 56). Beigefügt sind jeweils die entsprechenden Daten aus der pTAC/LNAscr und der sham-Gruppe.



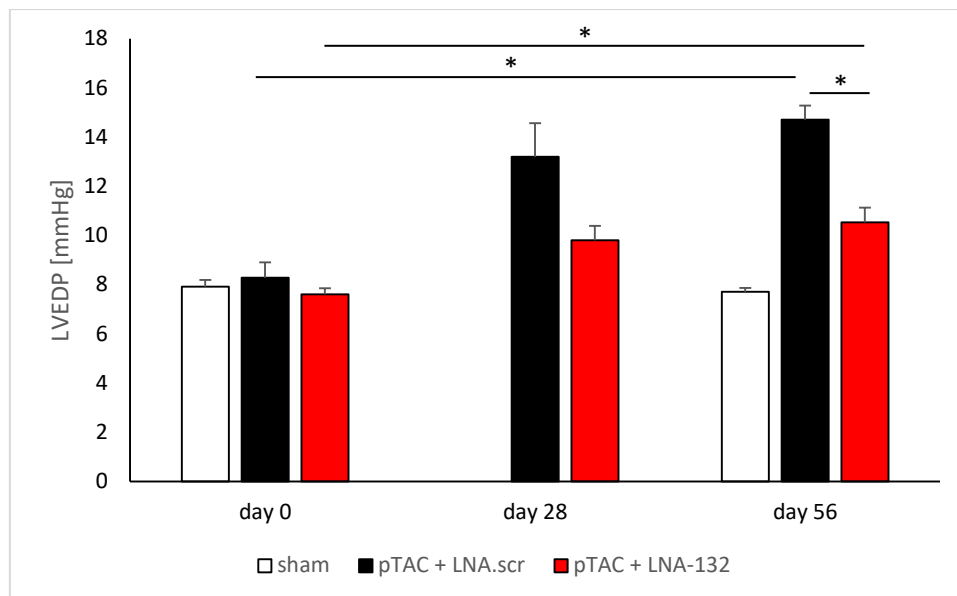
**Abbildung 27: Zunahme des AP in der pTAC/LNA-132 Gruppe von 85.9 mmHg auf 99.4 mmHg nach Implantation des Reduktionsstents, sowie auf 111.9 mmHg beziehungsweise 127.9 mmHg im Versuchsverlauf verglichen mit sham und pTAC/LNAscr Tieren. (n=6, Mean  $\pm$  SEM)**



### 3.2.1.2. Globale Myokardfunktion

#### 3.2.1.2.1. Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)

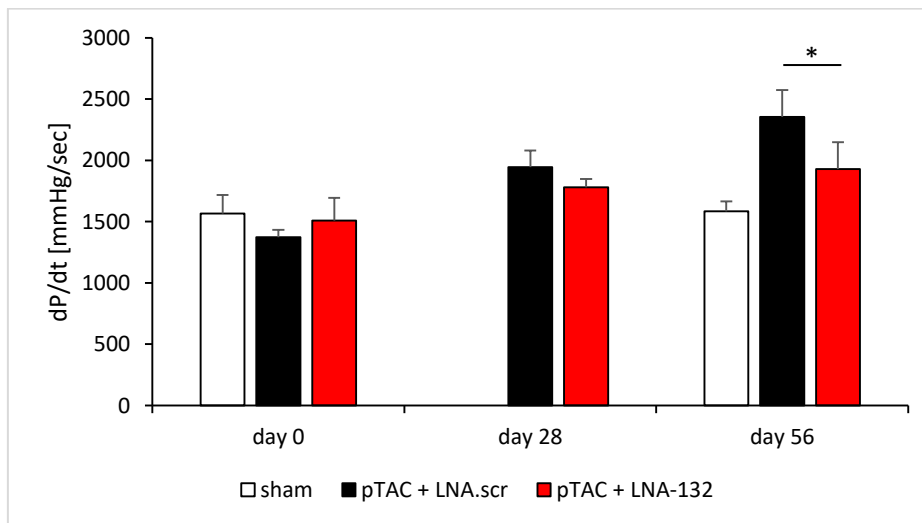
Die Tiere der pTAC/LNA-132 Gruppe konnten im Versuchsverlauf ihren LVEDP besser konservieren. Es zeigte sich zwar ein signifikanter Anstieg des LVEDP in der pTAC/LNA-132 Gruppe im Versuchsverlauf (day 0 vs. day 56). Jedoch ist der LVEDP am letzten Versuchstag (day 56) dennoch signifikant weniger hoch als in der pTAC/LNAscr Gruppe. In dieser Gruppe hatte sich im Versuchsverlauf ebenfalls ein signifikanter Anstieg des LVEDP gezeigt. Der Anstieg in der pTAC/LNA-132 Gruppe erfolgt von  $7.6 \pm 0.2$  mmHg an Versuchstag 1 (day 0) über  $9.8 \pm 0.6$  mmHg auf  $10.5 \pm 0.6$  mmHg am letzten Versuchstag (day 56).



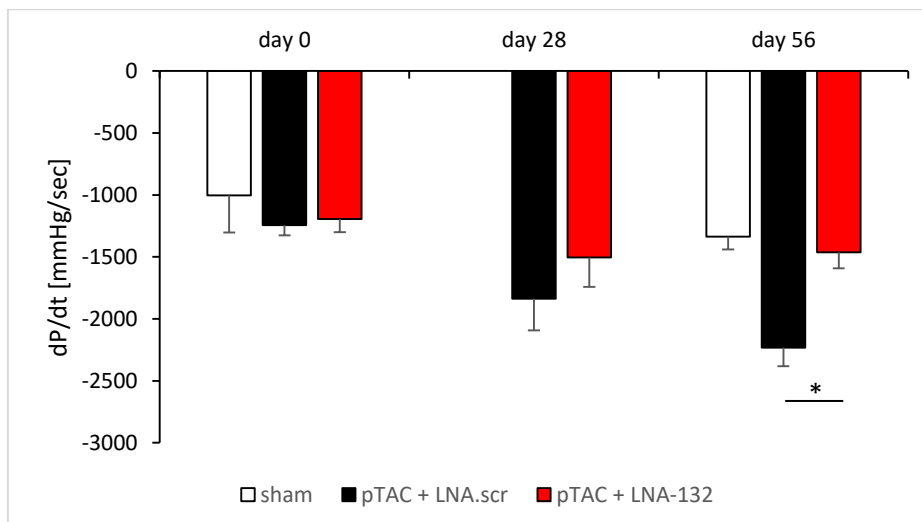
**Abbildung 28:** Der LVEDP kann in der pTAC/LNA-132 Gruppe auf einem signifikant niedrigeren Niveau konserviert werden. Er steigt im Versuchsverlauf zwar signifikant an (day 0 vs. day 56), jedoch lediglich von 7.6 mmHg über 9.8 mmHg auf 10.5 mmHg im Vergleich zur pTAC/LNAscr Gruppe an. (n=6, Mean  $\pm$  SEM, \* p < 0.05 day 0 vs. day 56 pTAC/LNA-132, pTAC/LNA-132 vs. pTAC/LNAscr day 56)

### 3.2.1.2.2. Kontraktion und Relaxation

Als Parameter für die Kontraktilität, beziehungsweise die Relaxation verändert sich der  $dP/dt_{\max}$  beziehungsweise  $dP/dt_{\min}$  im Versuchsverlauf in der pTAC/LNA-132 Gruppe nur geringfügig: das Ausgangsniveau kann nahezu konserviert werden. So steigt der  $dP/dt_{\max}$  von  $1508 \pm 186$  mmHg/s über  $1780 \pm 67$  mmHg/s auf  $1927 \pm 221$  mmHg/s. Der  $dP/dt_{\min}$  verhält sich korrelierend: Er sinkt von  $-1193 \pm 106$  mmHg/s auf  $-1504 \pm 237$  mmHg/s und wird zum Versuchsende wieder etwas positiver mit  $-1462 \pm 128$  mmHg/s.



**Abbildung 29:  $dP/dt_{\max}$  im Versuchsverlauf. Signifikant geringere Zunahme am letzten Versuchstag (day 56) im Vergleich zur pTAC/LNAscr Gruppe. (n=6, Mean  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$  pTAC/LNA-132 vs. pTAC/LNAscr, day 56)**

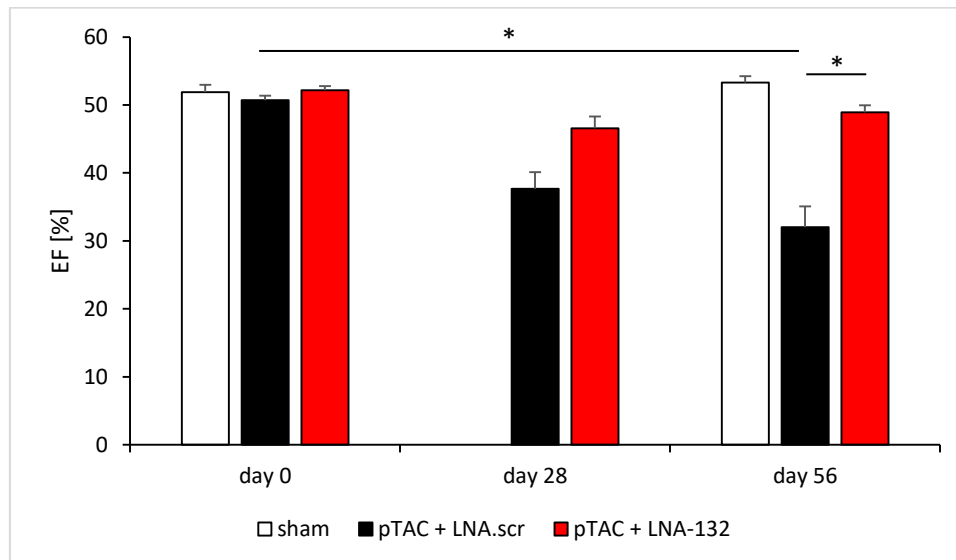


**Abbildung 30:  $dP/dt_{\min}$  im Versuchsverlauf. Signifikant geringere Zunahme am letzten Versuchstag (day 56) im Vergleich zur pTAC/LNAscr Gruppe. (n=6, Mean  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$  pTAC/LNA-132 vs. pTAC/LNAscr, day 56)**

### 3.2.1.2.3. Ejektionsfraktion (EF)

Als weiterer Parameter zur Beurteilung der globalen Myokardfunktion wurde wie oben beschrieben die Auswurfraction (EF) herangezogen. Hierbei wurde sichtbar, dass die LNA-132 therapierten Tiere ihren Ausgangswert mit einer EF von  $52.1 \pm 0.6 \%$  nahezu beibehalten. Im Versuchsverlauf nahm sie dann lediglich über  $46.6 \pm 1.7 \%$  auf  $48.9 \pm 1.0 \%$  ab.

Innerhalb der pTAC/LNAscr Gruppe zeigt sich eine signifikante Abnahme der EF im Versuchsverlauf. Im Vergleich mit der sham-Gruppe ergibt sich bei den pTAC/LNA-132 Tieren keine signifikante Reduktion der EF.

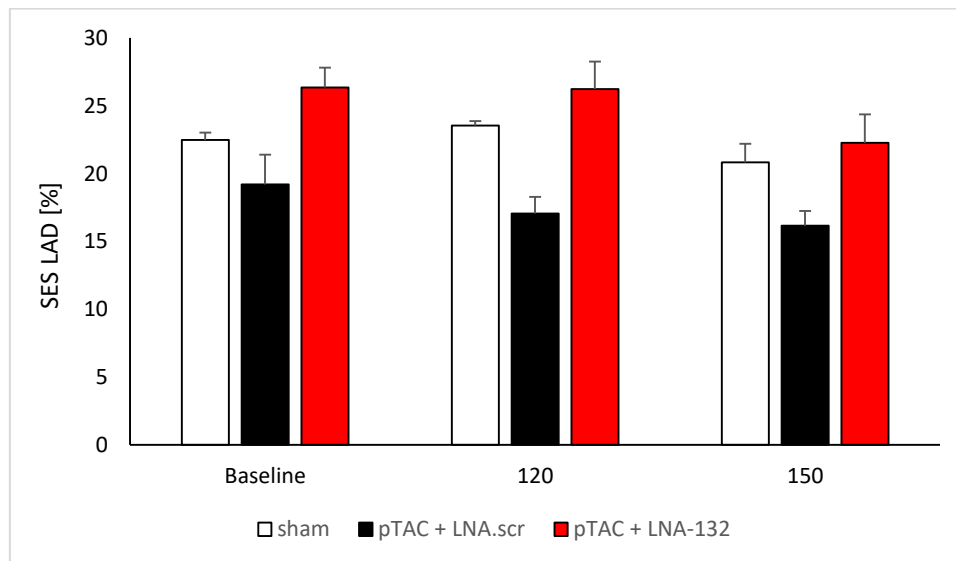


**Abbildung 31:** Die Ejektionsfraktion in der pTAC/LNA-132 Gruppe ist am letzten Versuchstag (day 56) signifikant höher als bei den pTAC/LNAscr Tieren. Der Ausgangswert von  $52.1 \%$  kann im Versuchsverlauf nahezu konserviert werden ( $48.9 \%$  day 56). (n=6, Mean  $\pm$  SEM, \* p < 0.05 pTAC/LNA-132 vs. pTAC/LNAscr, day 56; day 0 vs. day 56 pTAC/LNAscr)



### 3.2.1.3. Regionale Myokardfunktion

Bei der Analyse der regionalen Myokardfunktion zeigte sich, dass die mit LNA-132 therapierten Tiere die Segmentverkürzung (SES) unter einer Stimulation von 150 Schlägen pro Minute erhalten, also ihre funktionelle Reserve bewahren können. Im Detail wiesen sie eine Segmentverkürzung von 26.3 % als Baseline auf. Unter rechtsatrialem Pacing bei 120 bpm zeigte sich eine Segmentverkürzung von 26.2 % und bei 150 bpm 22.3 %.

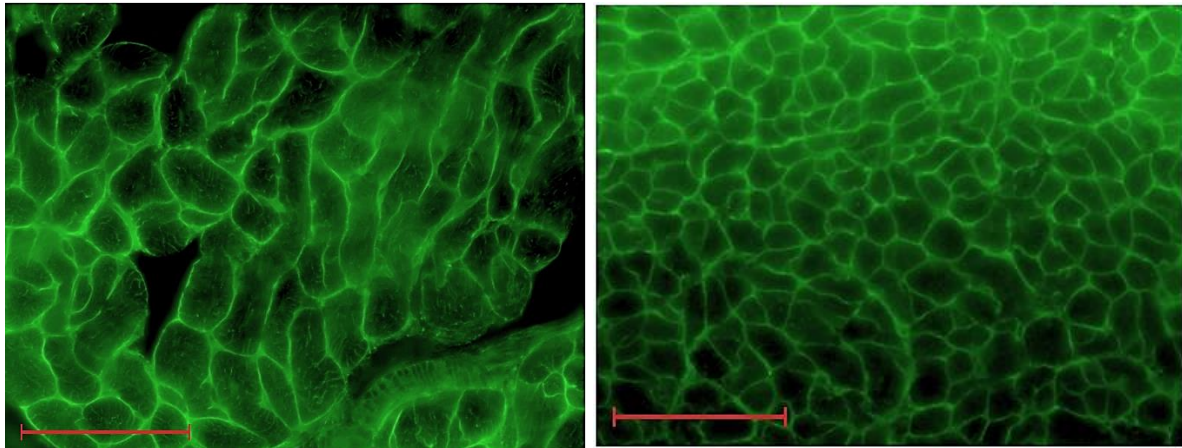


**Abbildung 32: Lokale Myokardfunktion, gemessen mittels Sonomikrometrie an Versuchstag 56 in Ruhe, sowie unter Schrittmacher-Stimulation mit 120 und 150 Schlägen pro Minute. (n=6, Mean  $\pm$  SEM)**

### 3.2.2. Hypertrophie

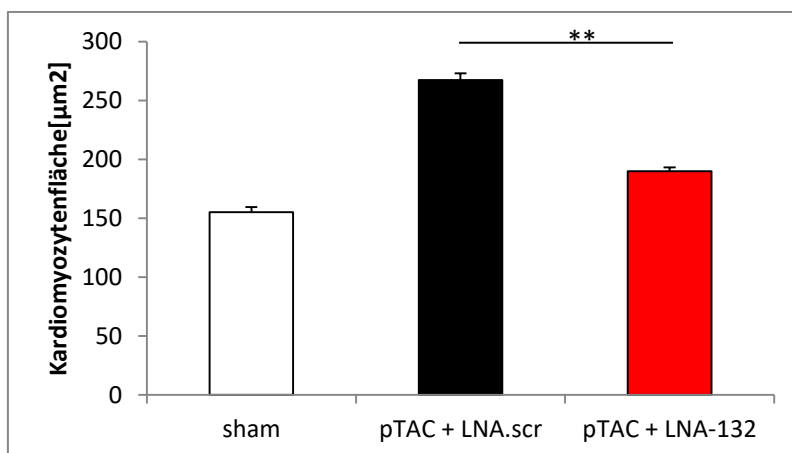
Auch die Tiere der Therapiegruppe (pTAC/LNA-132) wurden der gleichen histologischen und molekularbiologischen Analyse wie die pTAC Tiere und die sham-Tiere unterzogen.

So zeigte sich ebenfalls bereits optisch ein deutlicher Unterschied in der WGA-Färbung zwischen der Größe der Kardiomyozyten in der pTAC/LNAscr Gruppe und in der pTAC/LNA-132 Gruppe.



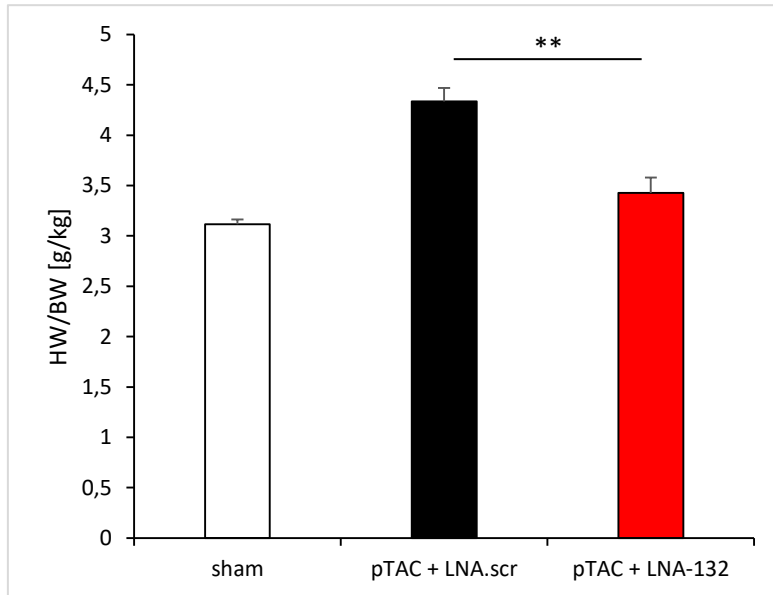
**Abbildung 33:** Hypertrophierte Kardiomyozyten eines pTAC/LNAscr Tieres (links) im optischen Vergleich mit einem Tier aus der pTAC/LNA-132 Gruppe (rechts). Dieses weist deutlich kleinere Zellen in der WGA-Färbung auf (Maßstabsskala 100  $\mu\text{m}$ ).

In der quantitativen Darstellung der mittleren Kardiomyozytenfläche zeigt sich, dass die Tiere der pTAC/LNA-132 Gruppe mit einem Wert von  $189.87 \pm 3.18 \mu\text{m}^2$  eine hoch signifikant geringere mittlere Kardiomyozytenfläche aufweisen, als die Tiere der pTAC/LNAscr Gruppe ( $267.20 \pm 5.71 \mu\text{m}^2$ ) und damit fast auf dem Vergleichsniveau der sham-Tiere ( $155.16 \pm 4.32 \mu\text{m}^2$ ) liegen.



**Abbildung 34:** Nahezu konservierte Kardiomyozytenfläche in der pTAC/LNA-132 Gruppe mit  $189.87 \mu\text{m}^2$  im Vergleich zur sham-Gruppe ( $155.16 \mu\text{m}^2$ ), hoch signifikant geringere Kardiomyozytenfläche im Vergleich zu den pTAC/LNAscr ( $267.20 \mu\text{m}^2$ ) Tieren. (n=6, Mean  $\pm$  SEM \*\*  $p < 0.01$  vs. pTAC/LNAscr)

Auch die HW/BW-Ratio verhält sich den Erwartungen entsprechend und weist ein signifikant geringeres Ergebnis in der pTAC/LNA-132 Gruppe auf:  $3.43 \pm 0.15$  g/kg vs.  $4.33 \pm 0.13$  g/kg in der pTAC/LNAscr Gruppe. Verglichen mit der sham-Gruppe ( $3.11 \pm 0.05$  g/kg) ergibt sich bei den pTAC/LNA-132 Tieren ein sehr ähnliches Ergebnis in der HW/BW-Ratio.



**Abbildung 35: Hoch signifikant geringeres Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht (HW/BW) in der pTAC/LNA-132 Gruppe im Vergleich zur pTAC/LNAscr Gruppe. (n=6, Mean  $\pm$  SEM \*  $p < 0.05$  pTAC/LNA-132 vs. pTAC/LNAscr)**

### 3.2.3. Kapillarisation

Neben der Kapillardichte wurde auch in der Therapiegruppe die Gefäßreifung mit der Anlagerung von Perizyten als Marker analysiert. Es zeigte sich eine starke Zunahme der mittleren Kapillarenzahl (Pecam-1) in der pTAC/LNA-132 Gruppe ( $647.2 \pm 17.1$ ) gegenüber der pTAC/LNAscr Gruppe ( $485.9 \pm 13.4$ ). Auch die Perizyten (NG2) verhielten sich konkordant und zeigten eine erhöhte Präsenz in der pTAC/LNA-132 Gruppe ( $420.5 \pm 15.4$ ) im Vergleich zu den Tieren der pTAC/LNAscr Gruppe ( $311.3 \pm 10.5$ ).

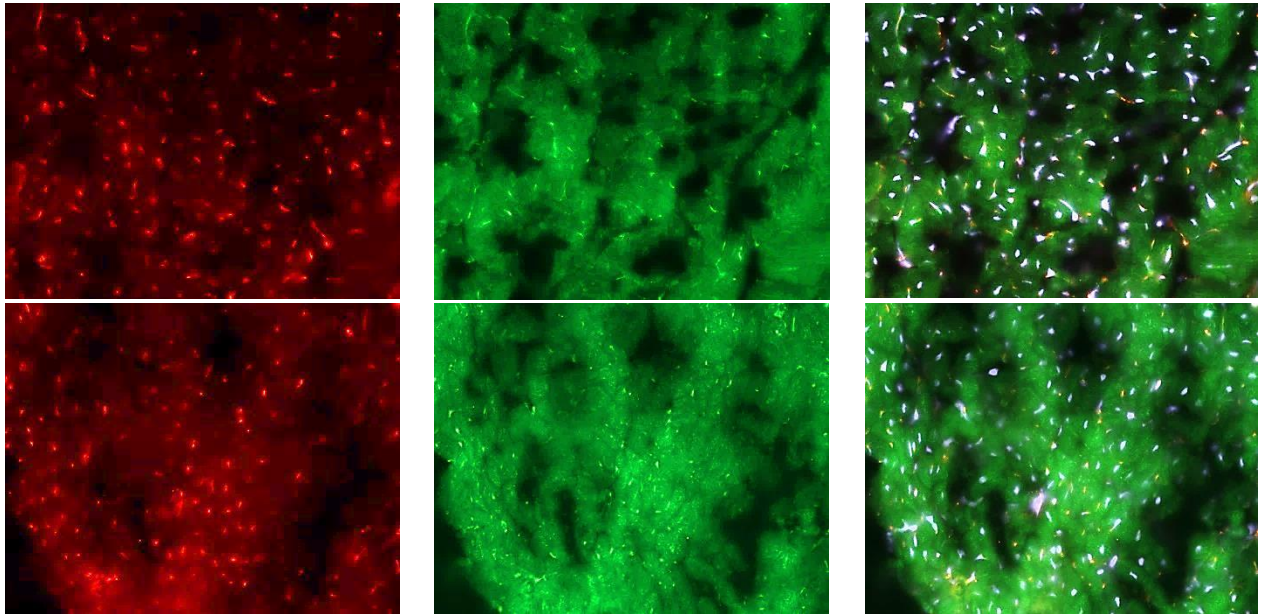


Abbildung 36: pTAC/LNAscr in der oberen Zeile vs. pTAC/LNA-132 unten. Links die Kapillaren in der Pecam-1-Färbung, in der Mitte die Perizyten in der NG2-Färbung, rechts merged mit DAPI.

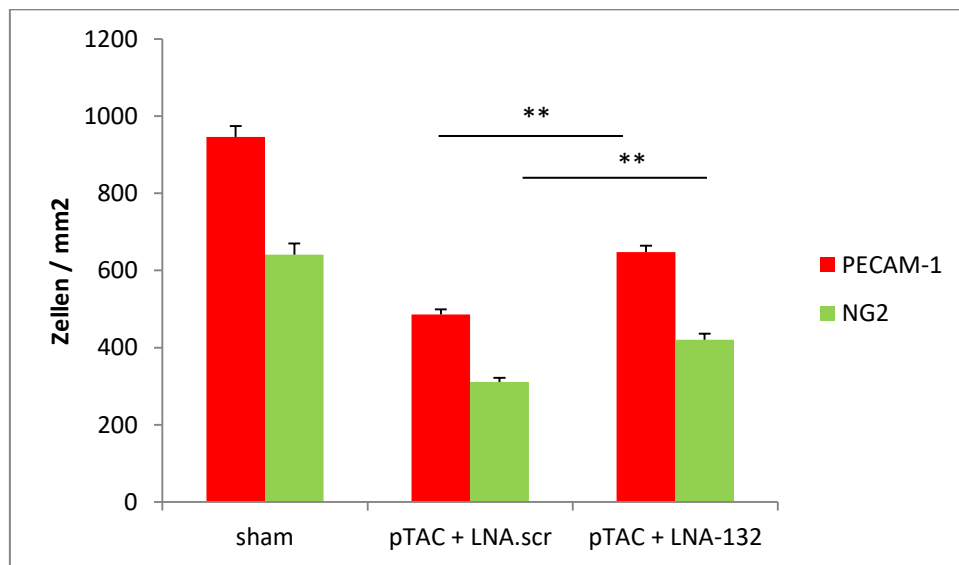
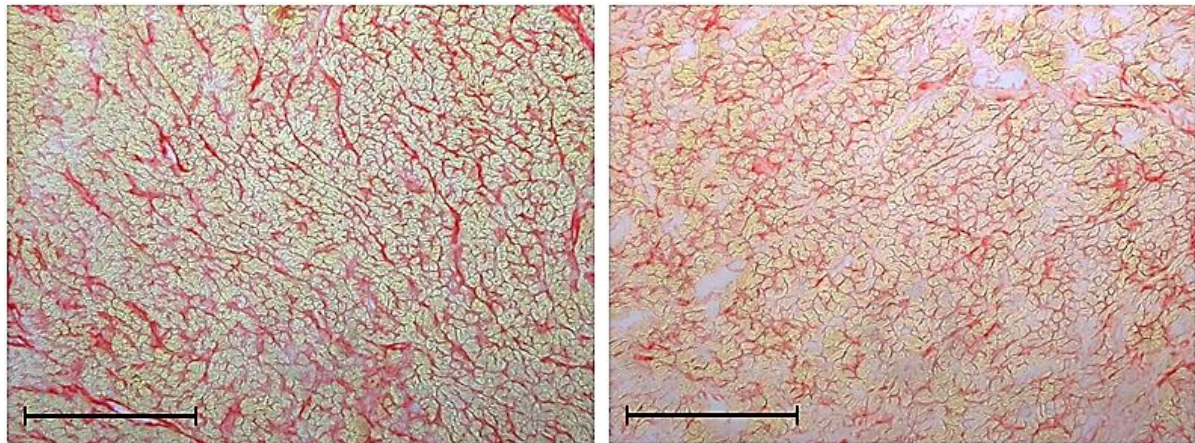


Abbildung 37: Hoch signifikant höhere Kapillardichte in der pTAC/LNA-132 Gruppe (647.2) im Vergleich zur pTAC/LNAscr Gruppe (485.9) dargestellt durch die Pecam-1-Färbung, sowie der Perizyten in der pTAC/LNA-132 Gruppe (420.5) im Vergleich zur pTAC/LNAscr Gruppe (311.3) analysiert durch die NG2-Färbung. (n=6, Mean  $\pm$  SEM \*\*  $p < 0.01$  pTAC/LNA-132 vs. pTAC/LNAscr).

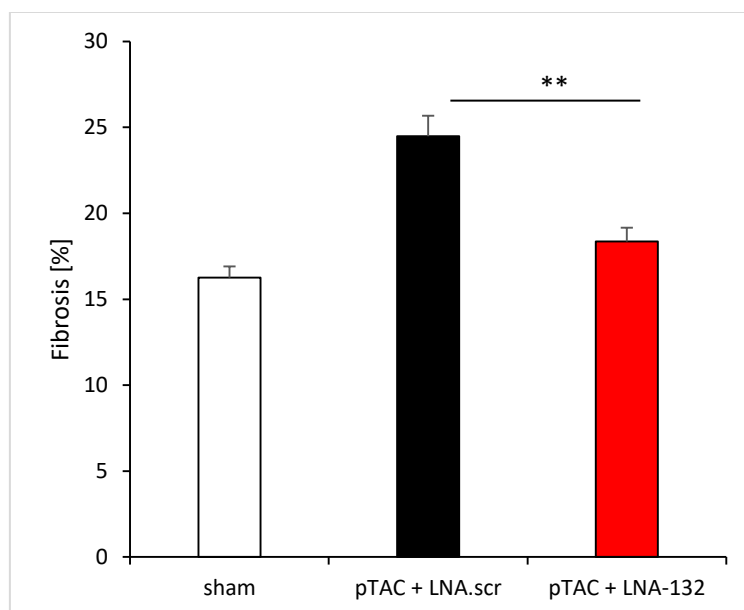
### 3.2.4. Fibrose

Ebenso wurde das Gewebe der Tiere aus der pTAC/LNA-132 der Sirius Red Färbung unterzogen, welche einen mittleren Fibrosegehalt nahe des Baseline-Wertes der sham-Tiere ( $16.3 \pm 0.6 \%$ ) aufwiesen, nämlich  $18.4 \pm 0.8 \%$ . Im Vergleich: in der pTAC/LNAscr Gruppe liegt der mittlere Fibroseanteil bei  $24.5 \pm 1.2 \%$ .

Auch hier imponiert der optische Unterschied zwischen den Gruppen:



**Abbildung 38:** Sirius Red Färbung bei einem pTAC/LNAscr Tier (linkes Bild) im optischen Vergleich mit einem pTAC/LNA-132 Tier (rechtes Bild), fibrotische Areale stellen sich rot dar (Maßstabsskala 100  $\mu\text{m}$ ).



**Abbildung 39:** Fibrosegehalt in Prozent Flächenanteil am linken Ventrikel, quantifiziert durch die Sirius Red Färbung. Die pTAC/LNA-132 Tiere weisen einen hoch signifikant niedrigeren Fibroseanteil (18.4 %) im Vergleich zu den pTAC/LNAscr Tieren (24.5 %) auf. (n=6, Mean  $\pm$  SEM \*\* p < 0.01 pTACLNA-132 vs. pTAC/LNAscr)



## **4. Diskussion**

Es gelang uns ein neues, perkutanes Modell der Herzinsuffizienz durch Drucküberlastung (pTAC-Modell) zu etablieren. Darüber hinaus konnten wir in unserem präklinischen Großtiermodell zeigen, dass die Inhibition von miRNA-132 myokardiale Hypertrophie und die Fibrosierung des Ventrikels effektiv verhindert, die Vaskularisierung verbessert, sowie die kardialen Funktionsparameter nahezu auf physiologischem Niveau erhält.

### **4.1. Das pTAC-Modell als neues translationales Großtiermodell zur Herzinsuffizienz**

#### **4.1.1. Vorteile eines Großtiermodells**

Eine Auswahl der vorhandenen Kleintiermodelle wurde bereits ausführlich vorgestellt (vgl. 1.3.). Maus- oder Rattenmodelle sind high-throughput Modelle, in denen rasch eine Vielzahl molekularer Mechanismen untersucht werden kann. Darüber hinaus haben Kleintiermodelle auch Nachteile - so ist es beispielsweise deutlich schwieriger, das notwendige chirurgische Geschick für Eingriffe an den feinen Strukturen eines Mäuseherzens zu erlangen. [111] Auch um hämodynamische Messungen durchzuführen ist große Expertise erforderlich. [111] Des Weiteren ist das Probenmaterial, welches aus Kleintieren gewonnen werden kann, sehr limitiert. Außerdem zeigen beispielsweise Mäuse spezie-spezifische Stammzelltypen und Expressionsmuster kontraktile Proteine im Vergleich zum Menschen. [110] Limitierend sind unter anderem der schnelle Herzschlag (300-600/min), sowie die atypischen Ionenströme in Nagerherzen. [124] Kleintiermodelle werden mit speziellen Labormäusen oder -ratten durchgeführt und entsprechen damit aufgrund der genetischen Monogenität nicht der genetischen Diversität von Menschen. [124] Im Hinblick darauf sind die in Großtiermodellen generierten Ergebnisse verlässlicher, da diese eine größere genetische Diversität abbilden. [124] Insofern erscheint es adäquat, weitere translationale Forschung in präklinischen Großtiermodellen durchzuführen, um dadurch die Sicherheit und Effektivität eines Verfahrens oder einer Therapie zu testen. [124] Der größte Nachteil der existierenden Tiermodelle im Schwein betrifft die hohen Kosten und den Aufwand, insbesondere was Haltung und Versuche betrifft, speziell im Vergleich mit Maus- oder Rattenmodellen. [109]

Die translationale Signifikanz wird in Großtiermodellen dadurch noch erhöht, dass Komorbiditäten leichter in die Modelle integriert werden können. [124] Interessanterweise

wurde bereits 2012 durch Yarbrough *et al.* [125] ein Hypertrophiemodell im Schwein beschrieben. Die Verringerung des aortalen Durchmessers und damit die Drucküberlastung wurden jedoch durch die chirurgische Insertion eines aufblasbaren Cuffs um die aufsteigende Aorta erreicht. [125] Mit der durchgeführten, linksseitigen Thorakotomie gehen sämtliche Risiken eines chirurgischen Eingriffs einher, so kann es beispielsweise zu Inflamationsreaktionen, größeren Blutungen und Verletzungen von benachbartem Gewebe oder Gefäß-Nervensträngen, sowie zu einer Lungenembolie kommen. [126]

Demgegenüber steht als großer Vorteil das perkutane Vorgehen im Vordergrund unseres neuen Modells. Um den Reduktionsstent zu implantieren ist lediglich ein kleiner Hautschnitt, sowie die Präparation der A. carotis nötig und auch für die Erhebung der Messdaten an den folgenden Versuchstagen wird nicht invasiver vorgegangen (vgl. 2.1.2.) Darüber hinaus sind die Applikationsarten in unserem Modell klinisch relevant, therapeutische Substanzen können lokal per Katheter direkt ins gewünschte Areal appliziert werden und es können die gleichen Kathetermodelle wie in der Humanmedizin verwendet werden. Auch die Schleusen und Führungsdrähte sind übertragbar.

Im Gegensatz zum etablierten TAC-Mausmodell, steht darüber hinaus bei unserem Modell der Vorteil einer verbesserten Follow up-Zeit. Die Durchführung multipler Messungen stellt, genauso wie die regionale Applikation beispielsweise therapeutischer Substanzen, auch im Versuchsverlauf dank des perkutanen Zugangsweges kein Problem dar. Darüber hinaus ist das vorgestellte Modell auch potentiell reversibel: die Membran des Reduktionsstents kann perkutan mittels eines Katheters problemlos aufgedehnt werden. Dies könnte einer Simulation des Krankheitsverlaufes nach ärztlicher Intervention entsprechen.

#### **4.1.2. Interaktion zwischen Hämodynamik, Hypertrophie und Fibrose**

In unserem neuen Modell konnten wir den Entstehungsverlauf der drucküberlastungsinduzierten Herzinsuffizienz abbilden (vgl. 3.1.) und das komplexe Ineinandergreifen der diversen Pathomechanismen (vgl. 1.1.3.) analysieren.

Die Drucküberlastung des linken Ventrikels, als mechanische Komponente der Hypertonie, ist mit die häufigste Ursache der chronischen Herzinsuffizienz und trägt somit substantiell zur kardiovaskulären Morbidität und Mortalität bei (vgl. 1.1.). [1, 3, 127, 128] Dabei wird grundsätzlich von der Annahme ausgegangen, dass es mit persistierender Hypertension, beziehungsweise Drucküberlastung, zu einem Übergang von der kompensierten linksventrikulären Hypertrophie zur Herzinsuffizienz kommt. [128, 129] Die arterielle

Hypertonie selbst ist gut erforscht und entwickelt sich unter anderem auf dem Boden einer genetischen Prädisposition, eines Atherosklerose-prädisponierenden Lifestyle, der morphologischen Komponente Fibrose und dem mechanischen Faktor der Drucküberlastung. [3, 127]

Insbesondere die Veränderungen der Hämodynamik durch Drucküberlastung rücken ins Zentrum des Interesses.

So konnten wir in unserem Modell zeigen, dass bereits direkt nach Implantation des Reduktionsstents ein Druckanstieg in der prästenotischen Aorta stattfindet (vgl. Abb. 11-13). Diese Druckerhöhung setzt sich konstant bis zum Versuchsende fort (vgl. Abb. 11), was sich durch das fortschreitende Wachstum der Tiere im Versuchsverlauf erklärt, da dies wiederum einen proportional wachsenden Blutdruck erfordert. Darüber hinaus kommt es zu einer intrinsischen Triggerung der körpereigenen Regulationsmechanismen (vgl. 1.1.3.). Ebenso zeigt sich eine Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks im Versuchsverlauf (s. Abb. 14), was einer Einschränkung der globalen Myokardfunktion im Sinne der Herzinsuffizienz entspricht.

Ebenfalls als Parameter der globalen und speziell der systolischen Myokardfunktion dient die Ejektionsfraktion. Sie sinkt im Versuchsverlauf auf Werte  $\leq 35\%$  (s. Abb. 17) ab, was beim Patienten laut aktueller Leitlinie eine Indikation für eine ICD oder CRT-Therapie wäre. [1] Damit deckt das vorliegende Modell auch Patienten mit einer schweren Herzinsuffizienz ab. Durch die unter 2.1.3. beschriebene Messung der regionalen Myokardfunktion zeigt sich in den hämodynamischen Veränderungen der Einfluss der lokalen Myokardschädigung durch Fibrose und Hypertrophie. So nimmt die subendokardiale Segmentverkürzung des Herzmuskels im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren deutlich ab (s. Abb. 18), was auf eine eingeschränkte Herzmuskelleistung verweist.

Entscheidend für die Entstehung und den Schweregrad einer Herzinsuffizienz, ist darüber hinaus auch die Schädigung des Herzmuskels auf zellulärer Ebene im Sinne von Hypertrophie und Fibrose, welche sich in oben beschriebenen Veränderungen der Hämodynamik widerspiegelt.

Hypertrophie ist prinzipiell definiert als eine Größenzunahme des Myozyten. [24]

Die kardiale Hypertrophie lässt sich ätiologisch in eine physiologische und pathologische Variante unterteilen. Trotz der deutlichen Unterschiede zwischen physiologischer und pathologischer Hypertrophie ist es wahrscheinlich, dass es sich nicht um binär verschiedene Phänotypen handelt, sondern ein Kontinuum an Zuständen kardialer Plastizität. [28]

Zu den physiologischen Ursachen der Herzhypertrophie zählen: Körperliche Betätigung,



Schwangerschaft und postnatales Wachstum. Diese fördern das physiologische Wachstum des Herzens und induzieren keine Änderung von kardialen Strukturen oder Funktionen. [24]

Im Gegensatz dazu können zum Beispiel neurohumorale Aktivierung oder chronische hämodynamische Überlastung ein pathologisches Wachstum im Sinne einer Hypertrophie verursachen. [130, 131] Des Weiteren kommt es bei der durch Hypertension, Klappenventilen oder Ischämie verursachten Hypertrophie zu abnormen metabolischen, strukturellen und funktionalen Veränderungen. Unter diesen Bedingungen resultieren Veränderungen der Kontraktilität, systolische und/oder diastolische Dysfunktion, sowie Verlust an Kardiomyozyten mit fibrotischem Ersatz. [24] Darüber hinaus wird das Risiko für Herzinsuffizienz und maligne Arrhythmien erhöht. [128, 132]

Limitierender Faktor für die Myokardhypertrophie ist unter anderem die Blutversorgung, welche bei zu starkem Herzmuskelwachstum wesentlich beeinträchtigt wird. [133]

Bei einer pathologischen Hypertrophie kann ab einem gewissen Ausmaß an Hypertrophie die Neubildung von Kapillaren nicht mehr mit dem Fortschreiten der Hypertrophie Schritt halten (vgl. Abb. 23-24). Im vorliegenden Modell zeigt sich im pTAC-Modell eine signifikant schlechtere Kapillarisation im Vergleich zu den sham-Tieren (vgl. 3.1.3.). Auch die Gefäßreifung kann mit fortschreitender, pathologischer Myokardkräftigung nicht ausreichend stark zunehmen (vgl. Abb. 23-24). Eine Einschränkung der relativen Myokarddurchblutung tritt durch den erhöhten Sauerstoff- und Substratbedarf des hypertrophierten Herzens bei einer relativ konstanten Perfusion durch epikardiale Koronargefäße auf. [133] In Folge der Hypertrophie erhöht sich der Sauerstoffbedarf der Herzmuskelzellen, sodass sich ab einem kritischen Herzgewicht von 500 g die Perfusion besonders der endokardnahen Muskelschichten verschlechtert. [127] Die Minderperfusion bewirkt einen ATP-Mangel, woraus eine verminderte Myokardentspannung resultiert (vgl. Abb. 15-16).

In Bezug auf das Wachstumsmuster differenziert man konzentrische und exzentrische Hypertrophie: [134] Die konzentrische Hypertrophie, die auch im vorgestellten pTAC-Modell beobachtet werden kann (vgl. Abb. 19), resultiert oft aus einer Drucküberlastung. [24] Mit zunehmender Schwere der Herzinsuffizienz schlägt sie in eine Dilatation des Ventrikels mit beeinträchtigter Kontraktilität um. [24, 135] Im Vergleich dazu tritt die exzentrische Hypertrophie vor allem unter Bedingungen der isotonischen sportlichen Betätigung oder unter Volumenüberlastung, beziehungsweise post-Myokardinfarkt auf. [131]

Das Hypertrophiemuster ist dahingehend von Bedeutung, dass bei konzentrischem Remodeling durch Hypertension nur eine eher weniger schwerwiegende systolische Beeinträchtigung auftritt, [136, 137] während es bei exzentrischer Hypertrophie eher zu einer

schweren Dysfunktion kommt, vergleichbar mit dem Zustand nach einem Myokardinfarkt. (vgl. [138]) Dementsprechend ist die Art der Hypertrophie ausschlaggebend dafür, in welchem Ausmaß sie einen Risikofaktor für eine systolische Dysfunktion darstellt, beziehungsweise welche Rolle andere morphologische Komponenten, wie die Fibrose, eine Rolle für den Schweregrad der funktionellen kardialen Beeinträchtigung spielen. (vgl. [26-29])

Für die kardiale Funktion ergeben sich aus der Hypertrophie folgende Konsequenzen: Es kommt zu einer Hyperkontraktilität des linken Ventrikels und damit zu einer beschleunigten Austreibung des Blutes (90 % in der ersten Hälfte der Systole) und einer Erhöhung der Ejektionsfraktion. [139] Darüber hinaus wird das endsystolische Volumen verringert.

Durch die verdickte Wand kommt es zu einer Verminderung der Compliance, also zu einer vermehrten Steifheit des linken Ventrikels (vgl. Abb. 15-16). Dies wiederum bedingt eine diastolische Dysfunktion mit Beeinträchtigung der diastolischen Füllung des linken Ventrikels, Verkleinerung des enddiastolischen Volumens, mangelhafter Steigerungsfähigkeit des Minutenvolumens unter Belastung und beeinträchtigter, regionaler myokardialer Segmentverkürzung (vgl. Abb. 18).

Wie im vorliegenden Modell abgebildet, kommt es des Weiteren zu einem Anstieg des LVEDP (vgl. Abb. 14) mit Drucksteigerung im linken Vorhof, in den Lungenvenen und Lungenkapillaren, sowie zu Rhythmusstörungen. [139]

In der histologischen Analyse weisen die Kardiomyozyten der pTAC-Tiere im Querschnitt eine etwa doppelt so große Fläche auf wie die der Kontrolltiere. (vgl. Abb. 20-21)

Das Verhältnis zwischen Herzgewicht und Körpergewicht ist in der pTAC-Gruppe signifikant größer als in der Sham-Gruppe. (vgl. Abb. 22)

Wie oben bereits mehrfach erwähnt, spielt die Fibrosierung des Myokards eine große Rolle bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz. Ihre Ausprägung bestimmt maßgeblich den Schweregrad des Herzversagens mit.

Allen fibrotischen Prozessen im menschlichen Körper gemeinsam ist die Schädigung der Gewebearchitektur, sowie der zunehmende Funktionsverlust des jeweiligen Organs. [140]

Die morphologischen Gewebeeigenschaften, welche allgemein eine Fibrose definieren, sind die Anhäufung von extrazellulärer Matrix und der Verlust der zellulären Homöostase. [140] Es kommt zu einer vermehrten Neubildung von Kollagen Typ I und III. [133] Außerdem ist die Quervernetzung der Kollagene erhöht, was eine vermehrte Steifigkeit des Herzens erzeugt

und zu der häufig beobachteten diastolischen Dysfunktion (HFpEF) beiträgt. (vgl. Abb. 15-16)

Fibrose erscheint in morphologisch klar abgrenzbaren Formen: [29] So existiert eine reaktive Form im Sinne einer perivaskulären, beziehungsweise interstitiellen Fibrose ohne kardiomyozytäre Nekrose, sowie eine reparative Form, welche nekrotische Myozyten ersetzt. [141] Die Entstehung von fibrösem Gewebe an Orten myozytärer Verluste ist essentiell, um die strukturelle Integrität des Myokards zu bewahren. [29] Im Zusammenspiel mit der Myokardhypertrophie spielt die interstitielle Fibrose mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle beim Pumpversagen des Herzens. [133]

Initial beeinträchtigt die Bildung fibrösen Gewebes vor allem die diastolische, passive Relaxation und die Füllungsdynamik des Ventrikels durch die Versteifung des Gewebes, [142-149] darüber hinaus jedoch auch die systolische Funktion, insbesondere die Kontraktilität und konsekutiv die Ejektionsfraktion. [143, 150]

Aufgrund der Abflussbehinderung in der arteriellen Strombahn durch den Reduktionsstent ist der Herzmuskel gezwungen, verstärkt gegen den vergrößerten Auswurfwiderstand anzupumpen. Durch die vermehrte Herzarbeit kräftigt sich das Myokard und verliert unter anderem durch die größere Muskelmasse, vor allem jedoch durch den erhöhten Fibroseggrad, an Elastizität. Dies resultiert in erschwerter diastolischer Füllung, was klinisch mit der diastolischen Herzinsuffizienz korreliert.

Im vorgestellten pTAC-Modell zeigt sich anhand der Sirius Red Färbung, in der kollagene Fasern rot angefärbt werden [29], dass im linken Ventrikel der Sham-Tiere ein Grundgehalt an Kollagen von  $16.3 \% \pm 0.6$  vorhanden ist (vgl. Abb. 26). Im Gegensatz dazu wiesen die pTAC-Tiere ein deutlich höheres Fibroseniveau von  $26.4 \% \pm 0.6$  auf. (vgl. Abb.25)

Diese Fibrose ist am ehesten als reaktive, interstitielle Fibrose zu werten, die in den oben abgebildeten, exemplarischen Bildern unserer Sirius Red Färbung ersichtlich ist (vgl. Abb. 25). [29] In Korrelation mit den im Herzkatheter erhobenen Funktionsdaten zeigt sich eine deutliche Beeinträchtigung sowohl der diastolischen, als auch der systolischen Funktionsparameter: Es kommt zu einem signifikanten Anstieg des AP und des LVEDP, sowie zu einem signifikanten Abfall der Ejektionsfraktion (vgl. Abb. 11, 14, 17).

### 4.1.3. Varianten des Modells

Um das Potential des vorgestellten pTAC-Modells zu präzisieren, bietet sich die Möglichkeit die Pathomechanismen, sowie den Verlauf und die Therapiemöglichkeiten anderer Krankheiten zu analysieren.

Eine davon ist die Aortenklappenstenose, welche vor allem bei älteren Patientengruppen ein ebenfalls weitverbreitetes Krankheitsbild darstellt. [3, 151] Ähnlich wie bei einer Überlastung des Herzens durch erhöhten systemischen Blutdruck, kommt es bei der Aortenklappenstenose zu überhöhtem Auswurfwiderstand und folglich gesteigertem linksventrikulären Druck. [112] Verifizierbar ist dies unter anderem durch den entstehenden Druckgradienten über der Aortenklappe, also dem Druckunterschied zwischen linkem Ventrikel und der Aorta, welcher unter physiologischen Bedingungen kleiner 5 mmHg ist. [152] Die Höhe, Dauer und Progression dieses Gradienten bestimmen die myokardiale Reaktion. Ein ähnlicher Druckgradient entsteht in unserem Modell, allerdings nicht über der Aortenklappe, sondern in der Aorta. (vgl. Abb. 12-13)

Darüber hinaus wird die linksventrikuläre Hypertrophie durch den signifikant erhöhten Wandstress in der Systole stimuliert. [112] Wie in unserem Modell, ist die linksventrikuläre Hypertrophie im Rahmen einer Aortenklappenstenose charakteristischerweise konzentrisch (vgl. Abb. 19, vgl. 4.1.2.) Auch bei Betrachtung der Vorgänge auf zellulärem Niveau ist eine myozytäre Hypertrophie, übereinstimmend zum Modell zu beobachten. [153, 154] Darüber hinaus proliferieren die myokardialen Fibroblasten (vgl. Abb. 25, vgl. 3.1.4. und 4.1.2.). [112] Bei den meisten Formen der Aortenklappenstenose kommt es zu einer initialen Kompensationsphase, in der die Parameter der linksventrikulären Pumpfunktion, wie zum Beispiel die Ejektionsfraktion, noch normal sind (vgl. Abb. 17). Dennoch ist diese Phase bereits mit einer erhöhten Myozytenquerschnittsfläche und fortschreitender Anhäufung von extrazellulären Proteinen, sowie von Fibrose im Myokard assoziiert. In unserem neu etablierten Modell kommt es zu konkordanten Ergebnissen.

Die genannten Eigenschaften der Herzinsuffizienz durch Aortenklappenstenose finden sich in dem neu etablierten Herzinsuffizienzmodell im Schwein wieder und erlauben zukünftige Analysen dieses Krankheitsbildes. (vgl. Abb. 17, 20-21, 25-26)

Doch das Modell bietet noch weitere Forschungsansätze: Die Aortenklappenstenose betrifft vor allem ältere Patientengruppen, doch auch die Krankheiten Jüngerer werden mit abgebildet, so zum Beispiel die Hypertrophe Obstruktive Kardiomyopathie (HOCM).

Hierbei handelt es sich um eine Sonderform der Hypertrophen Kardiomyopathie (HCM), [139] deren Hauptsymptom die langsam progrediente, symmetrische oder asymmetrische Hypertrophie des linken Ventrikels ist. Meistens ist das Septum am stärksten betroffen. Histologisch zeigen die Herzmuskelfasern bei der HCM tendenziell eher eine wirbelförmige Anordnung. [139]

Die Disposition zu Arrhythmien resultiert aus der Überlastung der sekundär dilatierenden Vorhöfe, der Hypertrophie des Kammermyokards mit atypischem Faserverlauf, sowie der vor allem interstitiell auftretenden Fibrose. Bei der HOCM kommt es - anders als im vorliegenden Modell - des Öfteren zu einer dynamischen Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn. Diese entsteht vor allem in Fällen von asymmetrischer Septumhypertrophie bedingt durch Verlagerung des vorderen Mitralsegels in die Ausflussbahn. Während der Systole kommt es zu einer intraventrikulären Stenose, oft mit erheblichem Druckgradienten, besonders postextrasystolisch und bei anderen Bedingungen gesteigerter Kontraktilität. Das Obstruktionsphänomen tritt aber nur bei etwa 25 % der Patienten auf und ist bei diesen nicht konstant. [139] Die Therapie erfolgt medikamentös oder invasiv, beispielsweise mittels TASH (Transkoronare Ablation der Septumhypertrophie), welche durch die Verödung von koronaren Septalästen sehr wirksam zu einer Regression des Myokards führt [155].

Im vorliegenden Modell können die beschriebenen Charakteristika der HCM durch die Hypertrophie und die damit einhergehenden hämodynamischen Veränderungen (vgl. Abb. 11, 20-21, 25-26) mitabgebildet werden.

Die vielfältigen Facetten und Anwendungs- beziehungsweise Analysemöglichkeiten des neu etablierten pTAC-Modells sollen beispielhaft durch die beiden beschriebenen Krankheiten veranschaulicht werden. Es können also diverse Ätiologien und Formen der Herzinsuffizienz untersucht werden, wie beispielsweise die primär durch Drucküberlastung verursachte hypertensive Herzerkrankung, valvuläre Ursachen und Erbkrankheiten. Darüber hinaus ist es möglich RNA-, DNA- und Protein-Analysen durchzuführen, um neue Trigger und konsekutiv neue Therapiansätze für diese Erkrankung zu detektieren. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Analyse zu miRNA-132, beziehungsweise deren Inhibition durchgeführt.

## **4.2. Inhibition von miRNA-132 im Modell**

In den letzten Jahren wurde durch die Entdeckung der RNA-Subgruppe der miRNAs ein weites Feld mit neuem Therapiepotential in vielen Bereichen der Medizin eröffnet. So konnte die Bedeutung der miRNAs im Bereich der Onkologie bereits gezeigt werden. [88, 156] Doch auch in der Kardiologie wird die zentrale Rolle dieser kleinen RNA-Moleküle immer deutlicher: man weiß bereits seit längerem, dass der Funktionsverlust von Dicer, einem Schlüsselenzym der miRNA-Biogenese, bei Mäusen zu Kardiomyopathie und ventrikulärer Dysfunktion führt. [157] Die Analyse spezifischer miRNAs und ihre Regulation kardialer Mechanismen liegt daher nahe, um mechanistische Erkenntnisse zu gewinnen.

Ucar *et al.* [65] zeigten, dass die miRNA-212/132 Familie einen sehr starken Effekt auf kardiomyozytäre Hypertrophie hat und dass die Überexpression von miRNA-212/132 zu kardialer Hypertrophie führt. Dass die Inhibition von miRNA-212/132 in dieser Hinsicht kardioprotektiv zu sein scheint, wurde bereits im Mausmodell von Ucar *et al.* [65] überprüft. Erstmals konnten wir nun in unserem Modell zeigen, dass die Inhibition von miRNA-132 in präventiver Intention die myokardiale Hypertrophie und Fibrosierung des Ventrikels in Großtieren effektiv verhindert. Des Weiteren werden die kardialen Funktionsparameter nahezu auf physiologischem Niveau erhalten.

### **4.2.1. Beeinflussung von Hämodynamik, Hypertrophie und Fibrose**

Im vorgestellten Modell, wurde einer Untergruppe der Versuchstiere (pTAC/LNA-132) wie oben beschrieben LNA-132 als miRNA-Inhibitor verabreicht. Die resultierende Beeinflussung der hämodynamischen Parameter war beachtlich. So konnten die Tiere der pTAC/LNA-132 Gruppe den LVEDP auf einem signifikant niedrigeren Niveau konservieren (vgl. Abb. 28) und auch die Kontraktilität, beziehungsweise Relaxationsfähigkeit des Myokards konnte deutlich näher am Ausgangsniveau erhalten werden (vgl. Abb. 29-30). Auch die Ejektionsfraktion blieb nahezu erhalten (vgl. Abb. 31). Im Hinblick auf die regionale Myokardfunktion zeigt sich, dass die Tiere der pTAC/LNA-132 Gruppe ihre funktionelle Reserve unter Schrittmacherstimulation signifikant besser erhalten konnten als die Tiere der pTAC/LNAscR Gruppe (vgl. Abb. 32). Letzteres belegt die bereits von Ucar *et al.* [65] im Kleintiermodell getroffenen Aussagen: Die mit einem miRNA-132-Inhibitor behandelten Mäuse zeigten signifikant bessere Resultate in Bezug auf die Segmentverkürzung als die

Mäuse der TAC-Gruppe ohne Therapie. Auch das Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht ist sowohl in unserer Studie, als auch in der von Ucar *et al.* [65] in der anti-miR-132 Gruppe signifikant geringer als in der jeweiligen Kontrollgruppe. (vgl. Abb. 35)

Die Plastizität der Kardiomyozyten geht oft einher mit einer Reinduktion des „fetalen Genprogramms“, wobei die Muster der Genexpression denjenigen während der Embryonalentwicklung nachempfunden sind. [24] Auch im Hinblick auf die Beeinflussung der Hypertrophie bestätigen sich die Ergebnisse der Kleintierstudie von Ucar *et al.* [65]: Die Tiere der pTAC/LNAscR Gruppe zeigten im Versuchsverlauf eine deutlich vermehrte Größenzunahme der Kardiomyozyten. Die pTAC/LNA-132 Gruppe wies eine dezente Zunahme im Vergleich zur sham-Gruppe auf, jedoch war die mittlere Kardiomyozytenfläche signifikant geringer als in der pTAC/LNAscR Gruppe (vgl. Abb. 33-34). Die Differenz zur sham-Gruppe ist der vermehrten Herzarbeit geschuldet, dennoch zeigt sich in der hämodynamischen Analyse kein Hinweis auf eine schwerwiegende systolische und/oder diastolische Dysfunktion (vgl. Abb. 27-32). Insbesondere ergab sich kein erhöhtes Risiko für maligne Arrhythmien. Zusätzlich kam es in der Therapiegruppe unserer Studie zu einer Induktion des Gefäßwachstums und der Gefäßreifung (vgl. Abb. 36-37 und [93]).

Kumarswamy *et al.* [93] konnten bereits 2014 die Wichtigkeit des miRNA-212/132 Clusters für die Angiogenese und Endothelfunktion zeigen: In einem Mausmodell konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die Inhibition von miRNA-212/132 die vasodilatatorische Endothelfunktion steigert, sowie die angiogenetische Antwort sowohl postnatal als auch in erwachsenen Mäusen verbessert. Interessanterweise haben miRNA-212 und miRNA-132 trotz der gleichen Kernsequenz unterschiedlich starke Effekte auf das Verhalten von Endothelzellen: während bereits der Einfluss von miRNA-132 auf die Endothelzellmigration beachtlich ist, scheint der von miRNA-212 noch um ein Vielfaches stärker zu sein. Der proangiogenetische Effekt von miRNA-132 konnte in den Arbeiten von Katare *et al.* [158] und Lei *et al.* [159] bestätigt werden. Konkordant zu den Ergebnissen von Ucar *et al.* [65] zeigte sich eine verminderte linksventrikuläre Fibrosierung in der pTAC/LNA-132 Gruppe (vgl. Abb. 38-39), die Arbeit von Eskildsen *et al.* [160] bestätigt den Einfluss der miRNA-212/132-Familie auf die Fibrosierung: Ihre Überexpression führt über die Regulation von diversen Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen, unter anderem der Angiotensin II-Signalweg, zu einer gesteigerten Zellgröße von kardialen Fibroblasten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass wir durch die Etablierung unseres Großtiermodells einen wichtigen Beitrag zur Translation von Forschungsergebnissen aus Kleintiermodellen (vgl. [65]) leisten konnten.

Darüber hinaus ist jedoch die Wirkweise, beziehungsweise der Einfluss von miRNA-132 in anderen Krankheitsbildern, vor allem jenen aus dem weiten Kreis des metabolischen Syndroms, nicht zu vernachlässigen: so zeigt sich beispielsweise, dass Patienten mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH) und KHK eine signifikant geringere Expression von zirkulierender miRNA-132 aufweisen als Patienten die an NASH, jedoch nicht an KHK erkrankt waren. [161] Die Diskrepanz zu früher publizierten Daten bezüglich der intrazellulären Expression von miRNA-132, lässt sich laut den Autoren hypothetisch dadurch erklären, dass die zirkulierenden Mengen an miRNA die Balance zum intrazellulären miRNA-Level darstellen. Weiterführende Studien könnten diese Form der Inter-Organ-Kommunikation erleuchten. [161]

In der Pathophysiologie des akuten Asthma bronchiale konnte miRNA-132 als regulatorischer Faktor identifiziert werden, es zeigt sich ein Anstieg der miRNA-132-Expression um etwa das Zweifache ca. 6 Stunden nach Allergenexposition. [162]

Auch bei seltenen Erkrankungen wie der Friedreich-Ataxie spielt miRNA-132 eine Rolle, es zeigen sich signifikant höhere miRNA-132-Spiegel in Patienten mit Friedreich-Ataxie als in gesunden Kontrollen. [163]

Ein wichtiger Grundsatz der modernen Medizin lautet, dass Prävention immer besser ist als Therapie. In diesem Sinne ist auch der Versuchsverlauf in unserem Modell angelegt: indem die LNA-132 bereits an Versuchstag 1 (day 0) verabreicht wird, soll der präventive Charakter der miRNA-Inhibition auf die Entstehung der pTAC-induzierten Herzinsuffizienz abgebildet werden. Eine weitere Versuchsserie, bei der die Applikation von LNA-132 erst nach messtechnisch überprüfter Entstehung der Herzinsuffizienz erfolgt, würde vom präventiven zum therapeutischen Ansatz dieses miRNA-Inhibitors weiterführen. Diese Vorgehensweise könnte relativ realistisch die klinische hypertrophe Herzinsuffizienz und ihre Therapie im Sinne der Translation auf den Menschen abbilden.

#### **4.2.2. Vergleich mit anderen miRNAs**

Insgesamt gesehen, schaffen unsere Ergebnisse einen neuen Rahmen mit erweitertem Handlungsspielraum für die Therapie oder, wie in unserer Studie bereits angedacht, für die Prävention der Herzinsuffizienz. Kann sich jedoch die miRNA-132, beziehungsweise ihre Inhibition im Vergleich mit anderen, aktuell erforschten miRNAs behaupten?

Aus einer Vielzahl von miRNAs mit therapeutischem Potential für Hypertrophie und Fibrose



im Rahmen einer Herzinsuffizienz soll hier exemplarisch eine Auswahl diskutiert werden.

Wie unter 1.2.1. bereits vorgestellt, spielt die miRNA-1 eine prominente Rolle für die morphologische Entwicklung von Kardiomyozyten, sie ist eine der kardial am meisten exprimierten miRNAs und ihre Überexpression führt, ebenso wie die von miRNA-133 zu einer Milderung kardialer Hypertrophie. [70, 71, 77-79, 81] In Bezug auf die myokardiale Fibrosierung unter pathologischen Bedingungen zeigt sich, dass die miRNA-133, ebenso wie die miRNA-30 herunterreguliert werden. [77]

Die Überexpression von miRNA-489 führt ebenfalls zu einer reduzierten Hypertrophie in vitro und in vivo. [164] Interessanterweise kann diese miRNA indirekt über Ang II reguliert werden, was eine Vielzahl an Möglichkeiten eröffnet, da die Funktionsweise von Ang II bereits gut erforscht ist. Dies soll jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit sein. Die Inhibition von miRNA-199 führt ebenfalls zu einer Abschwächung des pathologischen Wachstums von Herzmuskelzellen, sowie zu einer geringer ausgeprägten Fibrosierung. [66] Die Überexpression von miRNA-195 führt im Kleintiermodell zu einer pathologischen Hypertrophie in Kardiomyozyten. [84, 85] In einer 2013 von Hinkel *et al.* [165] publizierten Studie zeigt sich das kardioprotektive Potential der Inhibition von miRNA-92, welche erstmals im Großtier analysiert wurde.

Darüber hinaus ist die miRNA-199b als Agonist bei der Entstehung pathologischer Hypertrophie bekannt. [86]

Auch die miRNA-21 steht im Interesse vieler verschiedener Forschungszweige der Medizin. So spielt die auf der chromosomalen Region 17q23.2 liegende miRNA nicht nur für Forscher im kardiovaskulären System eine zentrale Rolle, sondern auch für Onkologen, Entwicklungs- und Stammzellbiologen, sowie Altersforscher. [88] Was die Funktion der miRNA-21 und ihre Verteilung im Herzen betrifft, so ist die aktuelle Datenlage paradox [6]: Thum *et al.* [91] zeigten, dass die reife miRNA-21 sowohl im Normalzustand, als auch stressinduziert, vorwiegend in den Fibroblasten des Herzens exprimiert wird. [6] Unter anderem dadurch, trägt miRNA-21 zum myokardialen Remodeling im Sinne von interstitieller Fibrose durch pathologische Anhäufung von Kollagen und anderen extrazellulären Matrixproteinen bei. [66] Thum *et al.* [91] stellten die Hypothese auf, dass vermehrte interstitielle Fibrose sowie kardiale Umbauprozesse, welche charakteristisch für die Herzinsuffizienz sind, induziert werden. Das bedeutet folglich, dass der Aktivierung kardialer Fibroblasten eine primäre Rolle in myokardialen Erkrankungen zukommt und nicht wie bisher angenommen, die Fibrose eine sekundäre Folge des kardiomyozytären Schadens ist. [91] In einer neueren Arbeit zeigt dieselbe Arbeitsgruppe mit Bang *et al.* [92], dass jedoch der Komplementärstrang miRNA-

21\* wie oben bereits beschrieben, in Kardiomyozyten transportiert wird und dort zu einer zellulären Hypertrophie führt.

Tatsuguchi *et al.* [166] zeigen in ihrer Studie, dass miRNA-21 einen zwar subtilen, aber reproduzierbaren inhibitorischen Effekt auf die kardiale Hypertrophie hat und die Inhibition von miRNA-21 sogar Hypertrophie induzieren kann.

Cheng *et al.* [157] beschreiben in ihren Versuchen in einem Modell der ischämischen Präkonditionierung mit anschließender Reperfusion, dass die Inhibition von miRNA-21 die kardiale Situation deutlich verschlechtert, was auf eine protektive Funktion derselben in ischämischen Kardiomyopathien hindeutet. Darüber hinaus erhielt diese Arbeitsgruppe klare Hinweise darauf, dass miRNA-21 auch in Kardiomyozyten exprimiert wird und funktionalen Einfluss auf die Zelle nimmt. Die Inhibition von miRNA-21 könnte einen potentiellen Ansatz zur Reduktion der Fibroblastenproliferation darstellen, um dadurch sekundäres kardiales Remodeling im Rahmen struktureller Herzerkrankungen zu verhindern. [66]

Insgesamt gesehen, weist die Diversität und Wandelbarkeit dieser Ergebnisse darauf hin, dass nicht nur die miRNA-21 ein überaus interessantes Ziel der kardiologischen Forschung bleibt und dass längst noch nicht ihre komplette Funktions- und Wirkungsweise erforscht ist. Auch weitere miRNAs sollten auf die potentiellen Wirkungen ihrer Komplementärstränge und weiterer, bisher als „Zellabfall“ angesehener Strukturen, analysiert werden. Eine der ersten Studien, die sich mit der Rolle von miRNAs im Rahmen kardialer Hypertrophie beschäftigte, stammt aus der Arbeitsgruppe von E. Olson und zeigt die Schlüsselrolle von miRNA-208 [167]: Knockout-Mäuse (miRNA-208<sup>-/-</sup>) die im Versuchsverlauf in der TAC-Gruppe waren, zeigten signifikant weniger Hypertrophie, was darauf hindeutet, dass miRNA-208 spezifisch auf pathologische Stressoren reagiert. Darüber hinaus war diese Untergruppe der Versuchstiere auch resistenter gegen Fibrose. [167] Insgesamt zeigt sich, dass die Inhibition von miRNA-208 vor pathologischem kardialen Remodelling schützt. [168] Darüber hinaus besitzt sie noch die interessante Eigenschaft, dass miRNA-208 Inhibitoren die Gewichtszunahme im Rahmen einer high-fat Diät reduzieren und sowohl den Lipid- als auch den Glukosestoffwechsel verbessern. [168] Aktuell steht auch die Transdifferenzierung von Fibroblasten in Kardiomyozyten im Fokus der Forschung: Hier zeigte sich, dass die Kombination der oben erwähnten miRNA-1, -133a und 208a (miRcombo) effizient zu einer kardialen Umprogrammierung führt. [169] Die Addition von miRNA-499 verstärkt die Wirkung der miRcombo noch.

Wie oben bereits erwähnt, ist die von uns untersuchte miRNA-132 Teil der miRNA-212/132-Familie, sodass die Eigenschaften von miRNA-212 ebenfalls von Bedeutung sind. Es zeigt

sich, dass auch diese miRNA während kardialer Hypertrophie stark heraufreguliert wird. [65] Darüber hinaus steht das oben vorgestellte Potential im Hinblick auf Angiogenese im Blickpunkt. [93] Interessanterweise wird die miRNA-212/132-Familie unter physiologischen Bedingungen nur auf einem relativ niedrigen Niveau exprimiert und wird erst durch pathologische Stressoren funktionell bedeutsam. [77]

All diese miRNAs zeigen Potential im Hinblick auf ihre Wirkung auf kardiales Remodelling, die in unserer Studie verwendete miRNA-132, beziehungsweise ihre Inhibition zeigt sich jedoch aus unserer Sicht im Hinblick auf Wirksamkeit und Wirkmöglichkeiten überlegen: Der Einfluss auf Hypertrophie und Fibrose ist hochsignifikant, die hämodynamischen Effekte deutlich sichtbar. Darüber hinaus besteht ein beachtliches Potential bezüglich der Angiogenese und des Endothelzellverhaltens. Aktuell ist es nur möglich Aussagen über die präventive Wirkung der LNA-132 zu treffen, in einer weiteren Studie wäre es interessant den therapeutischen Aspekt zu prüfen, indem die LNA-132 erst zu einem späteren Zeitpunkt im Versuchsverlauf gegeben wird. Auch eine Analyse der kombinierten Wirkung einer Inhibition von miRNA-212/132 als miRNA-Familie birgt potentiell eine Vielfalt an therapeutischen Möglichkeiten. Schließlich lässt sich spekulieren, dass der Einsatz von LNA-132 in klinischen Studien womöglich eindeutigere Ergebnisse liefern wird, als beispielsweise miRNA-21 Inhibitoren mit all ihren gegensätzlichen Aspekten.

Insgesamt ist festzustellen, dass miRNAs und ihre Inhibitoren eine fundamentale Rolle in der kardiovaskulären Entwicklung und Differenzierung spielen und hochinteressante Ansätze zur Entwicklung neuer Therapie- und Präventionsstrategien bieten. [169, 170] Detaillierte Phase I und II Studien, sowohl in der Kardiologie als auch in anderen Bereichen der Medizin werden in relativ naher Zukunft Realität sein, was den Weg für groß angelegte, mechanistisch orientierte Therapiestudien ebnen könnte. [168, 170, 171]

### 4.3. Klinischer Ausblick

MiRNAs stehen aktuell im Fokus einer Vielzahl an präklinischen, aber wie oben erwähnt auch klinischen Studien (vgl. [168, 170]). Im Bereich der kardiovaskulären Forschung ist der Einfluss von miRNAs auf Vaskularisation und Angiogenese, Arrhythmogenese, Atherosklerose, sowie Hypertrophie und Fibrose für viele einzelne miRNAs bereits gezeigt, auch wenn die Mechanistik dahinter in vielen Fällen noch nicht zur Gänze verstanden ist (vgl. 4.2.2.). [170] Jedoch ist das große Potential dieser RNA-Subgruppe hochevident und lenkt das Augenmerk nun auf den klinischen Einsatz jener Substanzen. Im Hinblick auf die Wirksamkeit einer neuen Substanzklasse bietet sich der Vergleich mit einer bereits erprobten Therapiekategorie an, so zum Beispiel mit den langjährig erfolgreich eingesetzten ACE-Hemmern. An Orten hoher Fibrosedichte wurde eine vermehrte ACE-Aktivität beobachtet. [29] Die Wirkweise der ACE-Hemmer wurde bereits unter 1.1.6.2. erläutert. Im Hinblick auf die oben diskutierten morphologischen Veränderungen, ist es von großem Interesse, in welchem Ausmaß der Einsatz dieser Pharmazeutika die Hämodynamik auf funktioneller, beziehungsweise auf struktureller Ebene beeinflusst.

Über die Effektivität und die Nebenwirkungen der „klassischen“ pharmazeutischen Therapie mittels ACE-Hemmer ist viel bekannt, im Folgenden sollen die „neuen“ potentiellen Therapeutika aus der miRNA-Substanzklasse näher beleuchtet werden.

Und zuletzt stellt sich die Frage, ob die potentiell präventive Wirkung der miRNAs, beziehungsweise ihrer Inhibitoren auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz nicht sogar altbewährte Therapiestrategien im Lauf der Zeit ersetzen wird? Zumindest werden sie in nicht allzu ferner Zukunft voraussichtlich eine nicht mehr wegzudenkende, ergänzende Therapiesäule sein.

Zunächst zum jeweiligen Einfluss der therapeutischen Substanzen auf die hämodynamische Funktion: Sowohl auf therapeutischer, als auch auf präventiver Ebene, zeigten sich ACE-Hemmer den Placebo-Regimes in der SOLVD I und II Studie überlegen. [172, 173] So profitierten Patienten mit bereits schwer ausgeprägter Herzinsuffizienz von einer signifikanten Reduktion der Mortalität und der Hospitalisierungsrate, die Ejektionsfraktion konnte ebenfalls signifikant besser bewahrt werden. [172, 174] Bei den Patienten mit asymptomatischer linksventrikulärer Dysfunktion kam es ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung der Hospitalisierungsrate, jedoch nicht zu einer Reduktion der Gesamtmortalität. Allerdings konnte die Inzidenz der Herzinsuffizienz signifikant verringert werden. Ebenfalls in beiden Studien konnte der systemische Blutdruck signifikant gesenkt werden, die hämodynamische

Situation wurde dementsprechend positiv beeinflusst.

Die Inhibition der miRNA-132 in unserem Modell bewirkt vergleichbar eine signifikante Verbesserung der Funktionsparameter im Vergleich zur pTAC/LNAscR Gruppe (vgl. Abb. 27-32). Ähnliche Daten gehen aus der Arbeit von Ucar *et al.* [65] hervor und demonstrieren die Wirksamkeit miRNA-basierter Therapien. Da zum jetzigen Zeitpunkt noch keine abgeschlossenen klinischen Studien zu kardiovaskulären Endpunkten mit miRNA-Inhibitoren vorliegen, existieren keine Langzeitdaten zum exakten Vergleich mit ACE-Hemmern. Jedoch lässt sich bereits aus den vorliegenden Daten schließen, dass ein vergleichbar signifikantes Wirkpotential vorhanden ist.

Laut der Arbeit von Pouleur *et al.* für SOLVD [174] wirken ACE-Hemmer trotz ihres gezeigten Einflusses auf die hämodynamische Funktion vorrangig über die Modulation der strukturellen Parameter: Die Autoren postulieren sowohl eine Verbesserung des kollagenen Matrix-Remodelings, als auch - über die Verringerung des Angiotensin II-Spiegels - eine Stimulusreduktion für die myokardiale Hypertrophie. Darüber hinaus zeigten ACE-Hemmer das Potential unerwünschtes, sogenanntes adverses Remodeling des Ventrikels in seinem Fortschreiten aufzuhalten, beziehungsweise in manchen Fällen sogar zurück zu bilden. [3, 4, 46, 174] Auch im Vergleich hierzu, zeigen sich die miRNA-Inhibitoren ebenbürtig: Eine signifikante Reduktion sowohl der Fibrose, als auch der Hypertrophie, sowie sogar eine verbesserte Kapillarisation resultieren aus der Anwendung von LNA-132 im vorliegenden Modell (vgl. Abb. 33-39).

Über die Therapie mit miRNA-Inhibitoren ist noch deutlich weniger bekannt, unter anderem, weil sich viele Studien noch in ihrer präklinischen Phase befinden. Dennoch ist zum Beispiel bereits im Mai 2013 der erfolgreiche Einsatz eines miRNA-122-Inhibitors, Miravirsin, ohne Dosis-limitierende Nebenwirkungen in einer Phase-II-Studie zur chronischen Hepatitis C dokumentiert worden. [76] Auch aus der Nephrologie gibt es neuere Entwicklungen: In einer Arbeit von Loboda *et al.* [175] zeigt sich, dass die Hochregulation von miRNA-21 über eine Veränderung von Stoffwechselprozessen zu renaler Fibrose führt, während in einer gesunden Niere miRNA-21 nur auf sehr niedrigem Schwellenniveau exprimiert wird. In einer kranken Niere hingegen wird die epitheliale miRNA-21 aktiv. [175] Jedoch scheint es auch in der Nephrologie keine eindeutige Wirkweise von miRNA-21 zu geben, auch hier gibt es Hinweise, dass sie auch protektives Potential besitzt: in Patienten mit diabetischer Nephropathie ist die glomeruläre miRNA-21 positiv mit dem Albumin/Kreatinin-Quotienten

assoziiert, während der Verlust von miRNA-21 in beschleunigtem glomerulären Schaden, bis hin zur Apoptose der Podozyten resultiert. [175]

Darüber hinaus ist beispielsweise, wie oben bereits angesprochen, die Applikation der miRNA-basierten Therapien nicht unproblematisch: Aktuell werden miRNA-Inhibitoren noch lokal und damit invasiv appliziert. Auch das genaue Therapieregime befindet sich noch in der Erprobungsphase und wird voraussichtlich für jede miRNA individuell anzupassen sein.

Für die Therapie speziell mit LNA-132 gibt es vor allem Daten aus präklinischen Untersuchungen mit Mäusen. Interessante Eckpunkte lassen sich aus der Arbeit von Ucar *et al.* [65] ableiten: wie unter 1.2.1. erläutert, können miRNAs mehrere Zielgene gleichzeitig in einer Zelle regulieren. Daraus folgt, dass zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund möglicherweise noch unbekannter Zielgene von miRNA-132, die Möglichkeit besteht, dass diese ebenfalls zur Entstehung der beobachteten Ergebnisse beigetragen haben. So könnte es laut den Autoren beispielsweise sein, dass miRNA-132 nicht nur in Kardiomyozyten wirkt, sondern ebenso einen Einfluss auf kardiale Fibroblasten und die kardiale Kapillardichte hat. [65] Die Ergebnisse aus den Analysen in unserem Modell scheinen diese Einschätzung zu bestätigen (vgl. 3.2.)

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass nicht nur andere kardiale Zielgene beeinflusst werden. Theoretisch ist die Beeinflussung von Regulationsmechanismen im ganzen Körper möglich, beispielsweise in der Leber oder in der Niere. Hierzu besteht großer Forschungsbedarf und Expressionsanalysen, sowie weitere Untersuchungen zur Wirkung von miRNA-132 auf andere Körperzellen, werden aktuell durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Therapie mit miRNA-Inhibitoren, insbesondere mit LNA-132, großes therapeutisches Potential für die Krankheit Herzinsuffizienz besitzt. Jedoch gilt es etwaige Nebenwirkungen und Einflussfaktoren auf die Lebensqualität der Patienten noch genauer zu erforschen. Auch die Korrelation der Daten aus unserem Modell mit denen aus klinischen Studien, stellt natürlich nur eine idealisierte Momentaufnahme dar und ist jederzeit kritisch zu hinterfragen, da ein Modell trotz aller Bestrebungen die klinische Realität immer nur bedingt abbilden kann.

Darüber hinaus hat sich in der Vergangenheit gezeigt, dass ACE-Hemmer, wie oben bereits angedeutet, präventives Potential besitzen (vgl. 1.1.6.2. und [174]). Im Moment allerdings, wird dieses Potential vor allem zur Prävention einer kardialen Verschlechterung, beziehungsweise zur Rezidivprophylaxe nach einem bereits erfolgten kardiovaskulären Ereignis genutzt, [1, 3, 174] man spricht in diesem Sinne von Tertiärprävention. Welche

umfassende Veränderung im Hinblick auf Morbidität, Mortalität und Krankheitskosten der Herzinsuffizienz könnte erreicht werden, wenn man stattdessen eine neue primärpräventive Maßnahme etablieren könnte?

Bei diesem Stand der Dinge scheint es nicht unnötig oder übertrieben, noch einmal neue und bislang unerprobte Substanzen ins Zentrum des Interesses zu rücken: die miRNA-Inhibitoren. Doch in unserem Modell, wie in vielen weiteren Modellen und Studien, haben die miRNA-Inhibitoren ihr Wirksamkeitspotential eindrucksvoll unter Beweis gestellt (vgl. 1.2. / 4.2. / Abb. 27-39 / [65, 77, 84, 91, 176]) Im Zuge der Etablierung eines Screeningverfahrens zeichnet sich aktuell ein neues Einsatzgebiet der miRNAs ab: van Rooij *et al.* [168] sowie mehrere andere Forschungsgruppen postulieren das stabile Vorkommen von miRNAs in Körperflüssigkeiten von Patienten mit Herz-Kreislaufkrankungen. Dadurch können sie potentiell als Biomarker für kardiovaskuläre Krankheiten genutzt werden. [177-179]

In einer groß angelegten Studie von Karakas *et al.* [180] zeigt sich der prädiktive Wert von miRNA-132: der zirkulierende Spiegel von miRNA-132 korreliert in einem Kollektiv von Patienten mit koronarer Herzerkrankung präzise mit dem Risiko für kardiovaskulären Tod. Dadurch könnte sie sich als wertvoller Biomarker für die Risikostratifizierung bei KHK-Patienten, der darüber hinaus einfach aus dem peripheren Blut zu bestimmen ist, erweisen. [180] Ähnliche Ergebnisse werden in einer multizentrischen klinischen Studie von Masson *et al.* [181] präsentiert: In gut selektionierten Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz steigt der zirkulierende miRNA-132-Spiegel mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz an. Niedrigere Plasmaspiegel verbessern laut den Autoren die Risikovorhersage für stationäre Wiederaufnahmen aufgrund von Herzinsuffizienz.

Abschließend lässt sich festhalten, dass auf dem Gebiet der Therapie, beziehungsweise sogar der Prävention der Herzinsuffizienz noch lange nicht das letzte Wort gesprochen ist. Mit der zunehmenden Etablierung der miRNA-Inhibitoren als Therapeutika auch in anderen klinischen Bereichen [73-76], rücken diese immer mehr ins Zentrum des Interesses der klinischen Forschung. Ihr großes Potential haben sie bereits in diversen Studien (vgl. 4.2.2.) und auch in dieser Arbeit eindrucksvoll gezeigt, jetzt gilt es dieses auch im klinischen Einsatz unter Beweis zu stellen.

## **5. Zusammenfassung**

In der hier vorliegenden Arbeit gelang es erstmals ein perkutanes Modell der kardialen Hypertrophie (pTAC) im Schwein zu etablieren. Im Versuchsverlauf kam es zu einer globalen Abnahme der Herzleistung mit sowohl systolischer, als auch diastolischer Insuffizienz. Auf zellulärer Ebene kam es zur Zunahme von myokardialer Hypertrophie und Fibrose, sowie zu einer verschlechterten Kapillarisierung.

In einem weiteren Schritt wurde die antagonisierende Wirkung des MicroRNA-Inhibitors LNA132 auf die pTAC-induzierte Herzhypertrophie analysiert. Es zeigte sich eine deutliche Verbesserung der kardialen Funktion in den mit LNA132 therapierten Versuchsgruppen im Vergleich zu den untherapierten pTAC-Tieren. Dies konnte wiederum auf zellulärer Ebene verifiziert werden: es zeigte sich weniger Fibrose, weniger myokardiale Hypertrophie und eine verbesserte Kapillarisierung.

Das große Potential des therapeutischen Einsatzes von MicroRNA-Inhibitoren wurde nicht nur in dieser Arbeit gezeigt, nun gilt es die Translation in die Klinik vorzunehmen.



## 6. Abkürzungsverzeichnis

% SS	% segment shortening
A.	Arteria
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
AHA	American Heart Association
ANP	atriale natriuretic peptide
AP	Aortaler Druck
AT1	Angiotensin 1
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	brain natriuretic peptide
bp	Basenpaare
bpm	beats per minute
CRT	kardiale Resynchronisationstherapie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8
dLVP/dt	LVP abgeleitet nach der Zeit
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dP/dt	Druck abgeleitet nach der Zeit
EDL	enddiastolische Länge
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ERK-MAP Kinase	extracellular signal-regulated - mitogen-activated protein kinase
ESC	European Society of Cardiology
ESL	endsystolische Länge

EtOH	Alkohol
F	French
HFmrEF	Heart Failure with mid-range Ejection Fraction
HFpEF	Heart Failure with preserved Ejection Fraction
HFrEF	Heart Failure with reduced Ejection Fraction
HMV	Herzminutenvolumen
HOCM	Hypertrophe Obstruktive Kardiomyopathie
HTx	Herztransplantation
HW/BW	Heart Weight/Body Weight
HZV	Herzzeitvolumen
ICD	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
IE	Internationale Einheiten
ITR	Inverted Terminal Repeat
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
LAD	Left Anterior Descending Artery
LNA	locked nucleic acid
LVAD	Left Ventricular Assist Device
LVAS	Left Ventricular Assist System
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVM	linksventrikuläre Masse
LVP	Linksventrikulärer Druck
miRNA	micro RNA
MOE	Methoxyethylphosphorothioat
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid

NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NNT	Number-needed-to-treat
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
NT-proBNP	N-terminales proBNP
NYHA	New York Heart Association
OFR	Open Reading Frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEI	Polyethylenimine
pTAC	perkutane transverse aortale Konstriktion
pTAC/LNA-132	perkutane transverse aortale Konstriktion/locked nucleic acid
pTAC/LNAscr	perkutane transverse aortale Konstriktion/scrambled locked nucleic acid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RCX	Ramus circumflexus
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RR	Blutdruck (Riva-Rocci)
SEM	Standard Error of the Mean
SPRY 1	Sprouty Homolog 1
SS	Segment Shortening
TAC	transverse aortale Konstriktion
TASH	transkoronare Ablation der Septumhypertrophie
UTR	untranslated Region
WGA	Wheat Germ Agglutinin
β-MHC	β-Myosin Heavy Chain

## 7. Literaturverzeichnis

1. *Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz - Langfassung*. 2009, zuletzt geändert: August 2013, Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF): <http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/herzinsuffizienz>.
2. Hoppe UC, et al., *Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz*. 2005.
3. Herold, G., *Innere Medizin*. 2012 ed., Köln: Herold, Gerd.
4. Karow, T. and R. Lang-Roth, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 20 ed. 2012, Köln: Karow, T. 1275.
5. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur J Heart Fail, 2016. **18**(8): p. 891-975.
6. Small, E.M., R.J. Frost, and E.N. Olson, *MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease*. Circulation, 2010. **121**(8): p. 1022-32.
7. McMurray, J.J. and S. Stewart, *Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure*. Heart, 2000. **83**(5): p. 596-602.
8. HW, H., *Fact Sheet Herzinsuffizienz*. 2008.
9. Zugck, C., *Versorgungsrealität in Deutschland: Wird die Herzfrequenz bei chronischer systolischer Herzinsuffizienz ausreichend gesenkt?*, D.G.f.K.-H.-K. e.V., Editor. 2013, DGK: Düsseldorf.
10. Bursi, F., et al., *Systolic and diastolic heart failure in the community*. Jama, 2006. **296**(18): p. 2209-16.
11. Neumann, T., et al., *Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives*. Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(16): p. 269-75.
12. Stewart, S., et al., *Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century?* Heart, 2003. **89**(1): p. 49-53.
13. Heidenreich, P.A., et al., *Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association*. Circ Heart Fail, 2013. **6**(3): p. 606-19.
14. Go, A.S., et al., *Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2013. **127**(1): p. e6-e245.
15. (SIGN), S.I.G.N., *Management of chronic heart failure*. 2007: Edinburgh.
16. Lip, G.Y., C.R. Gibbs, and D.G. Beevers, *ABC of heart failure: aetiology*. Bmj, 2000. **320**(7227): p. 104-7.
17. Paulides, M. and L. Wojnowski, *[Chemotherapeutics-induced heart failure]*. Med Klin (Munich), 2007. **102**(7): p. 574-8.
18. Slordal, L. and O. Spigset, *Heart failure induced by non-cardiac drugs*. Drug Saf, 2006. **29**(7): p. 567-86.
19. Sengupta, P.P., et al., *Trastuzumab-induced cardiotoxicity: heart failure at the crossroads*. Mayo Clin Proc, 2008. **83**(2): p. 197-203.
20. Yeh, E.T., *Cardiotoxicity induced by chemotherapy and antibody therapy*. Annu Rev Med, 2006. **57**: p. 485-98.
21. Hessen, L., *Chronische Herzinsuffizienz. Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. Hausärztliche Leitlinie*. 2006: Köln.
22. van Rooij, E. and E.N. Olson, *MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2369-76.
23. Chien, K.R., *Stress pathways and heart failure*. Cell, 1999. **98**(5): p. 555-8.
24. Hill, J.A. and E.N. Olson, *Cardiac plasticity*. N Engl J Med, 2008. **358**(13): p. 1370-80.

25. McKinsey, T.A. and E.N. Olson, *Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 538-46.
26. Drazner, M.H., *The transition from hypertrophy to failure: how certain are we?* Circulation, 2005. **112**(7): p. 936-8.
27. Drazner, M.H., et al., *Increased left ventricular mass is a risk factor for the development of a depressed left ventricular ejection fraction within five years: the Cardiovascular Health Study*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(12): p. 2207-15.
28. Dorn, G.W., 2nd, *The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy*. Hypertension, 2007. **49**(5): p. 962-70.
29. Weber, K.T., *Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation*. Circulation, 1997. **96**(11): p. 4065-82.
30. Berk, B.C., K. Fujiwara, and S. Lehoux, *ECM remodeling in hypertensive heart disease*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 568-75.
31. van Rooij, E., W.S. Marshall, and E.N. Olson, *Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense*. Circ Res, 2008. **103**(9): p. 919-28.
32. Jackson, G., et al., *ABC of heart failure. Pathophysiology*. Bmj, 2000. **320**(7228): p. 167-70.
33. Arnold, J.M., et al., *Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference recommendations on heart failure update 2007: Prevention, management during intercurrent illness or acute decompensation, and use of biomarkers*. Can J Cardiol, 2007. **23**(1): p. 21-45.
34. Ertl, G. and C.E. Angermann, *[Therapy of chronic left heart failure]*. Internist (Berl), 2007. **48**(1): p. 59-65; quiz 66-7.
35. Large, S., *Surgery for heart failure*. Heart, 2007. **93**(3): p. 392-402.
36. Baker, D.W., et al., *Management of heart failure. III. The role of revascularization in the treatment of patients with moderate or severe left ventricular systolic dysfunction*. Jama, 1994. **272**(19): p. 1528-34.
37. Alderman, E.L., et al., *Results of coronary artery surgery in patients with poor left ventricular function (CASS)*. Circulation, 1983. **68**(4): p. 785-95.
38. Evangelista, L.S., L.V. Doering, and K. Dracup, *Usefulness of a history of tobacco and alcohol use in predicting multiple heart failure readmissions among veterans*. Am J Cardiol, 2000. **86**(12): p. 1339-42.
39. Evangelista, L.S. and P.S. Miller, *Overweight and obesity in the context of heart failure: implications for practice and future research*. J Cardiovasc Nurs, 2006. **21**(1): p. 27-33.
40. Fala, L., *Entresto (Sacubitril/Valsartan): First-in-Class Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibitor FDA Approved for Heart Failure*. Am Health Drug Benefits, 2016. **9**(Spec Feature): p. 78-82.
41. Shekelle, P.G., et al., *Efficacy of angiotensin-converting enzyme inhibitors and beta-blockers in the management of left ventricular systolic dysfunction according to race, gender, and diabetic status: a meta-analysis of major clinical trials*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(9): p. 1529-38.
42. Cleland, J.G., et al., *Effect of ramipril on morbidity and mode of death among survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. A report from the AIRE Study Investigators*. Eur Heart J, 1997. **18**(1): p. 41-51.
43. Kober, L., et al., *A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Trandolapril Cardiac Evaluation (TRACE) Study Group*. N Engl J Med, 1995. **333**(25): p. 1670-6.
44. Pfeffer, M.A., et al., *Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators*. N Engl J Med, 1992. **327**(10): p. 669-77.
45. Flather, M.D., et al., *Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group*. Lancet, 2000. **355**(9215): p. 1575-81.

46. Konstam, M.A., et al., *Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. SOLVD Investigators.* Circulation, 1992. **86**(2): p. 431-8.
47. Jong, P., et al., *Angiotensin receptor blockers in heart failure: meta-analysis of randomized controlled trials.* J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(3): p. 463-70.
48. Lee, V.C., et al., *Meta-analysis: angiotensin-receptor blockers in chronic heart failure and high-risk acute myocardial infarction.* Ann Intern Med, 2004. **141**(9): p. 693-704.
49. Dickstein, K. and J. Kjekshus, *Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan.* Lancet, 2002. **360**(9335): p. 752-60.
50. Pfeffer, M.A., et al., *Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both.* N Engl J Med, 2003. **349**(20): p. 1893-906.
51. Granger, C.B., et al., *Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial.* Lancet, 2003. **362**(9386): p. 772-6.
52. Chen, C.H., *Critical Questions about PARADIGM-HF and the Future.* Acta Cardiol Sin, 2016. **32**(4): p. 387-96.
53. *The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial.* Lancet, 1999. **353**(9146): p. 9-13.
54. Hjalmarson, A., et al., *Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF).* MERIT-HF Study Group. Jama, 2000. **283**(10): p. 1295-302.
55. Krum, H., et al., *Effects of initiating carvedilol in patients with severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS Study.* Jama, 2003. **289**(6): p. 712-8.
56. Packer, M., et al., *Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure.* N Engl J Med, 2001. **344**(22): p. 1651-8.
57. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators.* N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 709-17.
58. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction.* N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1309-21.
59. Heart Failure Society Of, A., *HFSA 2006 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline.* J Card Fail, 2006. **12**(1): p. e1-2.
60. Hunt, S.A., et al., *2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation.* Circulation, 2009. **119**(14): p. e391-479.
61. Freemantle, N., et al., *Cardiac resynchronisation for patients with heart failure due to left ventricular systolic dysfunction -- a systematic review and meta-analysis.* Eur J Heart Fail, 2006. **8**(4): p. 433-40.
62. Bradley, D.J., et al., *Cardiac resynchronization and death from progressive heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials.* Jama, 2003. **289**(6): p. 730-40.
63. McAlister, F.A., et al., *Cardiac resynchronization therapy and implantable cardiac defibrillators in left ventricular systolic dysfunction.* Evid Rep Technol Assess (Full Rep), 2007(152): p. 1-199.
64. Kukreja, R.C., C. Yin, and F.N. Salloum, *MicroRNAs: new players in cardiac injury and protection.* Mol Pharmacol, 2011. **80**(4): p. 558-64.
65. Ucar, A., et al., *The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy.* Nat Commun, 2012. **3**: p. 1078.

66. Da Costa Martins, P.A. and L.J. De Windt, *MicroRNAs in control of cardiac hypertrophy*. Cardiovasc Res, 2012. **93**(4): p. 563-72.
67. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
68. Bernstein, E., et al., *Dicer is essential for mouse development*. Nat Genet, 2003. **35**(3): p. 215-7.
69. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
70. Cheng, Y., et al., *MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy?* Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1831-40.
71. Sayed, D., et al., *MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 416-24.
72. Thum, T., et al., *MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure*. Circulation, 2007. **116**(3): p. 258-67.
73. Lecellier, C.H., et al., *A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells*. Science, 2005. **308**(5721): p. 557-60.
74. Jopling, C.L., et al., *Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1577-81.
75. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
76. Janssen, H.L., et al., *Treatment of HCV infection by targeting microRNA*. N Engl J Med, 2013. **368**(18): p. 1685-94.
77. Thum, T. and G. Condorelli, *Long noncoding RNAs and microRNAs in cardiovascular pathophysiology*. Circ Res, 2015. **116**(4): p. 751-62.
78. Wang, Z., Y. Lu, and B. Yang, *MicroRNAs and atrial fibrillation: new fundamentals*. Cardiovasc Res, 2011. **89**(4): p. 710-21.
79. Li, Q., et al., *Attenuation of microRNA-1 derepresses the cytoskeleton regulatory protein twinfilin-1 to provoke cardiac hypertrophy*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 14): p. 2444-52.
80. Zhao, Y., E. Samal, and D. Srivastava, *Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis*. Nature, 2005. **436**(7048): p. 214-20.
81. Ikeda, S., et al., *MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(8): p. 2193-204.
82. Care, A., et al., *MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 613-8.
83. Matkovich, S.J., et al., *MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts*. Circ Res, 2010. **106**(1): p. 166-75.
84. van Rooij, E., et al., *A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18255-60.
85. Harris, K.S., et al., *Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2208-13.
86. Rane, S., et al., *An antagonism between the AKT and beta-adrenergic signaling pathways mediated through their reciprocal effects on miR-199a-5p*. Cell Signal, 2010. **22**(7): p. 1054-62.
87. Sucharov, C., M.R. Bristow, and J.D. Port, *miRNA expression in the failing human heart: functional correlates*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(2): p. 185-92.
88. da Costa Martins, P.A. and L.J. De Windt, *miR-21: a miRaculous Socratic paradox*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(3): p. 397-400.
89. Baggish, A.L., et al., *Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 16): p. 3983-94.
90. van Rooij, E., et al., *Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 13027-32.
91. Thum, T., et al., *MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 980-4.

92. Bang, C., et al., *Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy*. J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2136-46.
93. Kumarswamy, R., et al., *Vascular importance of the miR-212/132 cluster*. Eur Heart J, 2014. **35**(45): p. 3224-31.
94. Bridge, G., et al., *The microRNA-30 family targets DLL4 to modulate endothelial cell behavior during angiogenesis*. Blood, 2012. **120**(25): p. 5063-72.
95. Ebert, M.S., J.R. Neilson, and P.A. Sharp, *MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells*. Nat Methods, 2007. **4**(9): p. 721-6.
96. Ebert, M.S. and P.A. Sharp, *MicroRNA sponges: progress and possibilities*. Rna, 2010. **16**(11): p. 2043-50.
97. Petersen, M. and J. Wengel, *LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics*. Trends Biotechnol, 2003. **21**(2): p. 74-81.
98. Braasch, D.A. and D.R. Corey, *Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA*. Chem Biol, 2001. **8**(1): p. 1-7.
99. Koshkin A., S.S., Nielsen P., Rajwanshi V., Kumar R., Meldgaard M., Olsen C., Wengel J., *LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the Adenine, Cytosine, Guanine, 5-Methylcytosine, Thymine and Uracil Bicyclonucleoside Monomers, Oligomerisation, and Unprecedented Nucleic Acid Recognition* Tetrahedron 1998. **54**: p. 3607-3630
100. Ucar, A., et al., *miR-212 and miR-132 are required for epithelial stromal interactions necessary for mouse mammary gland development*. Nat Genet, 2010. **42**(12): p. 1101-8.
101. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**(suppl\_1): p. D140-D144.
102. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: tools for microRNA genomics*. Nucleic Acids Research, 2008. **36**(suppl\_1): p. D154-D158.
103. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. Nucleic Acids Research, 2011. **39**(suppl\_1): p. D152-D157.
104. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data*. Nucleic Acids Research, 2014. **42**(D1): p. D68-D73.
105. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. Curr Biol, 2002. **12**(9): p. 735-9.
106. Landgraf, P., et al., *A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1401-14.
107. Lui, W.O., et al., *Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(13): p. 6031-43.
108. Thum, T., et al., *The mirna-212/132 family as a therapeutic target*. 2013, Google Patents.
109. Milani-Nejad, N. and P.M. Janssen, *Small and large animal models in cardiac contraction research: Advantages and disadvantages*. Pharmacol Ther, 2013.
110. Dixon, J.A. and F.G. Spinale, *Large animal models of heart failure: a critical link in the translation of basic science to clinical practice*. Circ Heart Fail, 2009. **2**(3): p. 262-71.
111. Patten, R.D. and M.R. Hall-Porter, *Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present*. Circ Heart Fail, 2009. **2**(2): p. 138-44.
112. Houser, S.R., et al., *Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association*. Circ Res, 2012. **111**(1): p. 131-50.
113. Pfeffer, M.A., et al., *Myocardial infarct size and ventricular function in rats*. Circ Res, 1979. **44**(4): p. 503-12.
114. Inoko, M., et al., *Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats*. Am J Physiol, 1994. **267**(6 Pt 2): p. H2471-82.
115. Heyen, J.R., et al., *Structural, functional, and molecular characterization of the SHHF model of heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(5): p. H1775-84.
116. Rockman, H.A., et al., *Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 8277-81.



117. Rockman, H.A., et al., *ANG II receptor blockade prevents ventricular hypertrophy and ANF gene expression with pressure overload in mice*. Am J Physiol, 1994. **266**(6 Pt 2): p. H2468-75.
118. Abarbanell, A.M., et al., *Animal models of myocardial and vascular injury*. J Surg Res, 2010. **162**(2): p. 239-49.
119. Kasner, M., et al., *Utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of diastolic function in heart failure with normal ejection fraction: a comparative Doppler-conductance catheterization study*. Circulation, 2007. **116**(6): p. 637-47.
120. Stubenitsky, R., et al., *Cardiovascular effects of the novel Ca<sup>2+</sup>-sensitizer EMD 57033 in pigs at rest and during treadmill exercise*. Br J Pharmacol, 1997. **122**(7): p. 1257-70.
121. Flamm, S.D., et al., *Redistribution of regional and organ blood volume and effect on cardiac function in relation to upright exercise intensity in healthy human subjects*. Circulation, 1990. **81**(5): p. 1550-9.
122. Patel, D.J., et al., *HARMONIC ANALYSIS OF PRESSURE PULSES OBTAINED FROM THE HEART AND GREAT VESSELS OF MAN*. Am Heart J, 1965. **69**: p. 785-94.
123. Hagl, S., et al., *[Ultrasound transit-time method for evaluation of regional myocardial function (author's transl)]*. Thoraxchir Vask Chir, 1975. **23**(3): p. 291-7.
124. Lara-Pezzi, E., et al., *Guidelines for translational research in heart failure*. J Cardiovasc Transl Res, 2015. **8**(1): p. 3-22.
125. Yarbrough, W.M., et al., *Progressive induction of left ventricular pressure overload in a large animal model elicits myocardial remodeling and a unique matrix signature*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2012. **143**(1): p. 215-23.
126. *AllEx Chirurgie*. Vol. 2. 2014, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
127. *AllEx Innere Medizin*. Vol. 2. 2014, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
128. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. N Engl J Med, 1990. **322**(22): p. 1561-6.
129. Frohlich, E.D., et al., *The heart in hypertension*. N Engl J Med, 1992. **327**(14): p. 998-1008.
130. Lorell, B.H. and B.A. Carabello, *Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis*. Circulation, 2000. **102**(4): p. 470-9.
131. Dorn, G.W., 2nd, J. Robbins, and P.H. Sugden, *Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation*. Circ Res, 2003. **92**(11): p. 1171-5.
132. Koren, M.J., et al., *Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension*. Ann Intern Med, 1991. **114**(5): p. 345-52.
133. Erdmann, E., *Klinische Kardiologie*. Vol. 8. 2011, Heidelberg: Springer.
134. Ganau, A., et al., *Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension*. J Am Coll Cardiol, 1992. **19**(7): p. 1550-8.
135. Krayenbuehl, H.P., et al., *Left ventricular myocardial structure in aortic valve disease before, intermediate, and late after aortic valve replacement*. Circulation, 1989. **79**(4): p. 744-55.
136. Verdecchia, P., et al., *Adverse prognostic significance of concentric remodeling of the left ventricle in hypertensive patients with normal left ventricular mass*. J Am Coll Cardiol, 1995. **25**(4): p. 871-8.
137. Sadler, D.B., et al., *Systolic function in hypertensive men with concentric remodeling*. Hypertension, 1997. **30**(4): p. 777-81.
138. Devereux, R.B., et al., *Left ventricular systolic dysfunction in a biracial sample of hypertensive adults: The Hypertension Genetic Epidemiology Network (HyperGEN) Study*. Hypertension, 2001. **38**(3): p. 417-23.
139. Piper, W., *Innere Medizin*. 2 ed. Innere Medizin, ed. S. Medizin. 2013, Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
140. Thannickal, V.J., et al., *Fibrosis: ultimate and proximate causes*. J Clin Invest, 2014. **124**(11): p. 4673-7.
141. Weber, K.T. and C.G. Brilla, *Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system*. Circulation, 1991. **83**(6): p. 1849-65.
142. Doering, C.W., et al., *Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy*. Cardiovasc Res, 1988. **22**(10): p. 686-95.

143. Jalil, J.E., et al., *Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle*. Circ Res, 1989. **64**(6): p. 1041-50.
144. Bing, O.H., et al., *Mechanical properties of rat cardiac muscle during experimental hypertrophy*. Circ Res, 1971. **28**(2): p. 234-45.
145. Bing, O.H., et al., *The effect of lathyrogen beta-amino proprionitrile (BAPN) on the mechanical properties of experimentally hypertrophied rat cardiac muscle*. Circ Res, 1978. **43**(4): p. 632-7.
146. Thiedemann, K.U., et al., *Connective tissue content and myocardial stiffness in pressure overload hypertrophy. A combined study of morphologic, morphometric, biochemical, and mechanical parameters*. Basic Res Cardiol, 1983. **78**(2): p. 140-55.
147. Hess, O.M., et al., *Diastolic function and myocardial structure in patients with myocardial hypertrophy. Special reference to normalized viscoelastic data*. Circulation, 1981. **63**(2): p. 360-71.
148. Conrad, C.H., et al., *Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat*. Circulation, 1995. **91**(1): p. 161-70.
149. Litwin, S.E., et al., *Contractility and stiffness of noninfarcted myocardium after coronary ligation in rats. Effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition*. Circulation, 1991. **83**(3): p. 1028-37.
150. Pfeffer, J.M., et al., *Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat*. Am J Physiol, 1979. **237**(4): p. H461-8.
151. Salimi, N. *Miamed-Amboss*. 03.07.2015]; Available from: <https://amboss.miamed.de/library#xid=Zh0Zcf&anker=275190e57624c98e59ac028de5ddf93b>.
152. Krakau, I. and H. Lapp, *Das Herzkatheterbuch: diagnostische und interventionelle Kathetertechniken*. Vol. 4. 2013: Thieme. 456.
153. Hein, S., et al., *Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms*. Circulation, 2003. **107**(7): p. 984-91.
154. Spirito, P., et al., *Occurrence and significance of progressive left ventricular wall thinning and relative cavity dilatation in hypertrophic cardiomyopathy*. Am J Cardiol, 1987. **60**(1): p. 123-9.
155. Piper, W., *Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems*, in *Innere Medizin*. 2013, Springer Berlin Heidelberg. p. 1-180.
156. Krichevsky, A.M. and G. Gabriely, *miR-21: a small multi-faceted RNA*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(1): p. 39-53.
157. Chen, J.F., et al., *Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2111-6.
158. Katare, R., et al., *Ghrelin Promotes Functional Angiogenesis in a Mouse Model of Critical Limb Ischemia Through Activation of Proangiogenic MicroRNAs*. Endocrinology, 2016. **157**(2): p. 432-45.
159. Lei, Z., et al., *MicroRNA-132/212 family enhances arteriogenesis after hindlimb ischaemia through modulation of the Ras-MAPK pathway*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(8): p. 1994-2005.
160. Eskildsen, T.V., et al., *The microRNA-132/212 family fine-tunes multiple targets in Angiotensin II signalling in cardiac fibroblasts*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2015. **16**(4): p. 1288-97.
161. Mehta, R., et al., *Circulating miRNA in patients with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease*. BMJ Open Gastroenterol, 2016. **3**(1): p. e000096.
162. Rider, C.F., et al., *Controlled diesel exhaust and allergen coexposure modulates microRNA and gene expression in humans: Effects on inflammatory lung markers*. J Allergy Clin Immunol, 2016.
163. Quesada, M.P., et al., *Novel aberrant genetic and epigenetic events in Friedreich's ataxia*. Exp Cell Res, 2015. **335**(1): p. 51-61.
164. Wang, K., et al., *The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489*. Circ Res, 2014. **114**(9): p. 1377-88.

165. Hinkel, R., et al., *Inhibition of MicroRNA-92a protects against ischemia/reperfusion injury in a large-animal model*. *Circulation*, 2013. **128**(10): p. 1066-75.
166. Tatsuguchi, M., et al., *Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **42**(6): p. 1137-41.
167. van Rooij, E., et al., *Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA*. *Science*, 2007. **316**(5824): p. 575-9.
168. van Rooij, E. and E.N. Olson, *MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(11): p. 860-72.
169. Hodgkinson, C.P., et al., *MicroRNAs and Cardiac Regeneration*. *Circ Res*, 2015. **116**(10): p. 1700-11.
170. Thum, T., *MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine*. *EMBO Mol Med*, 2012. **4**(1): p. 3-14.
171. Small, E.M. and E.N. Olson, *Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology*. *Nature*, 2011. **469**(7330): p. 336-42.
172. *Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators*. *N Engl J Med*, 1991. **325**(5): p. 293-302.
173. *Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. The SOLVD Investigators*. *N Engl J Med*, 1992. **327**(10): p. 685-91.
174. Pouleur, H., et al., *Effects of long-term enalapril therapy on left ventricular diastolic properties in patients with depressed ejection fraction. SOLVD Investigators*. *Circulation*, 1993. **88**(2): p. 481-91.
175. Loboda, A., et al., *TGF-beta1/Smads and miR-21 in Renal Fibrosis and Inflammation*. *Mediators Inflamm*, 2016. **2016**: p. 8319283.
176. Fiedler, J., S. Batkai, and T. Thum, *MicroRNA-based therapy in cardiology*. *Herz*, 2014. **39**(2): p. 194-200.
177. Gupta, S.K., C. Bang, and T. Thum, *Circulating microRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010. **3**(5): p. 484-8.
178. Hunter, M.P., et al., *Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles*. *PLoS One*, 2008. **3**(11): p. e3694.
179. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(6): p. 654-9.
180. Karakas, M., et al., *Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease-results from the large AtheroGene study*. *Eur Heart J*, 2016.
181. Masson, S., et al., *Circulating microRNA-132 levels improve risk prediction for heart failure hospitalization in patients with chronic heart failure*. *Eur J Heart Fail*, 2017.

## **8. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiengangs für „Molekulare und Systembiologische Medizin angefertigt“. An dieser Stelle möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. T. Gudermann und Herr Prof. Dr. J. Heesemann für die Aufnahme in das Förderprogramm für Forschung und Lehre an der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herr Prof. Christian Kupatt für die Überlassung des Themas, seine Betreuung und stete Unterstützung. Er lehrte mich wissenschaftlich zu arbeiten, kritisch zu hinterfragen, sowie konstruktiv zu diskutieren und eröffnete mir die Möglichkeit, meine Arbeit auch auf größeren Tagungen zu präsentieren.

Ebenso dankbar bin ich Frau Dr. Rabea Hinkel, die mir als Betreuerin jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, immer ein offenes Ohr für die kleinen Sorgen des Labor- und Versuchsalldtags hatte und mich stets unterstützte.

Herzlichen Dank auch an mein Mitdotorandin Andrea Howe, die mir immer freundschaftlich zur Seite stand, sowie an Herr Cuong Kieu und Frau Elisabeth Raatz für die technische Hilfe und freundliche Laborassistenz.

Vor allem bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern und meinem Freund Dr. Martin Schwibach für die Unterstützung, Motivation und das Verständnis in jeder Lebenslage.

# Eidesstattliche Versicherung

Straub, Sarah

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Herzinsuffizienz durch Drucküberlastung im Schweinemodell;  
Rolle von miRNA-132

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Trostberg, 07.11.2017

Sarah Straub  
.....